

OSMAR ROBERTO DALLA SANTA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SALAMES ARTESANAIS E  
SELEÇÃO DE CULTURAS *STARTER* PARA A PRODUÇÃO DE  
SALAME TIPO ITALIANO

Tese apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Doutor em  
Tecnologia de Alimentos, Programa de  
Pós-Graduação em Tecnologia de  
Alimentos, Setor de Tecnologia,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Renato João  
Sossela de Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Nelcindo  
Nascimento Terra

CURITIBA  
2008

*Aos meus pais Francisco e Cecília Dalla Santa pelo exemplo, dedicação e orientação.*

*À minha esposa Herta e minha filha Bruna por caminharem junto em todos os momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Doutor Nelcindo Nascimento Terra, por sua permanente disposição em contribuir, pelo exemplo de conduta pessoal e profissional e por sempre me acolher como amigo.

Ao professor Doutor Renato João Sossela de Freitas, por sua amizade, orientação e por me acompanhar nesta caminhada.

Aos alunos de iniciação científica do Curso de Engenharia de Alimentos da UNICENTRO, Cristina Maria Zanette, Fernando Araújo Coelho e Loyse Tussolini pela amizade e contribuição na realização de atividades deste trabalho.

A todos da Universidade Federal de Santa Maria pela acolhida amiga e auxílio, em especial a Liana, Ana, Carlos, Bibiana, Ângela e Gustavo.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná por contribuírem com minha formação profissional.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UFPR pela amizade e companheirismo.

A Empresa LABORCLIN – Produtos para laboratório, pelo patrocínio parcial do projeto.

A todos meus amigos, em especial Lídia Stutz e Nereu Marcondes Pererira pela ajuda e agradável convivência.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iii
SUMÁRIO .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE QUADROS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 OBJETIVO GERAL .....	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1 ALIMENTOS FERMENTADOS .....	5
2.2 SALAMES .....	7
2.2.1 Matérias-Primas e Ingredientes Utilizados na Elaboração de Salames .....	11
2.2.1.1 Carnes .....	11
2.2.1.2 Gordura .....	13
2.2.1.3 Ingredientes de cura .....	14
2.2.2 Padrões de Identidade e Qualidade para Salames .....	17
2.2.2.1 Padrões físico-químicos para salames .....	17
2.2.2.2 Padrões microbiológicos para salames .....	18
2.2.3 Critérios de Seleção de Bactérias Lácticas para Uso como Culturas <i>Starter</i> em Salames .....	22
2.2.3.1 Capacidade de acidificação .....	23
2.2.3.2 Produção de dióxido de carbono .....	26
2.2.3.3 Produção de peróxido de hidrogênio .....	27
2.2.3.4 Produção de dextrana .....	27
2.2.3.5 Atividade bioprotetora .....	27
2.2.3.6 Atividade probiótica .....	31
2.3 ANTIOXIDANTES NATURAIS .....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.1 AMOSTRAS DE SALAMES .....	35
3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	35
3.2.1 Determinação do pH .....	35
3.2.2 Determinação da Atividade de Água (Aw) .....	35
3.2.3 Determinação de Umidade .....	36
3.2.4 Determinação de Cinzas .....	36
3.2.5 Determinação de Proteínas .....	36
3.2.6 Determinação de Lipídios .....	36
3.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	36
3.3.1 Contagem Total de Bactérias Mesófilas Aeróbias e/ou Facultativas .....	37
3.3.2 Contagem de Bolores e Leveduras .....	37
3.3.3 Contagem de Bactérias Lácticas .....	37
3.3.4 Contagem de Bactérias da Família <i>Micrococcaceae</i> .....	38
3.3.5 Contagem de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva .....	38

3.3.6	Contagem de Coliformes Totais, Coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i> .....	38
3.3.7	Determinação da Presença de <i>Salmonella</i> .....	38
3.3.8	Determinação da Presença de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	39
3.3.8.1	Teste de catalase .....	39
3.3.8.2	Teste de motilidade.....	40
3.3.8.3	Teste de redução do nitrato .....	40
3.3.8.4	Reação em Ágar Triplice Açúcar Ferro (TSI).....	40
3.3.8.5	Teste de verificação de hemólise.....	40
3.3.8.6	Teste de fermentação da dextrose, xilose, rhamnose, manitol, maltose e esculina.....	40
3.3.8.7	CAMP teste .....	41
3.4	ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	41
3.4.1	Caracterização e Identificação das Cepas de Bactérias Lácticas Isoladas.....	41
3.4.1.1	Determinação da morfologia celular e da reação de Gram.....	42
3.4.1.2	Produção de catalase e oxidase .....	42
3.4.1.3	Produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	42
3.4.1.4	Produção de gás (CO <sub>2</sub> ).....	42
3.4.1.5	Produção de cápsula (dextrana).....	43
3.4.1.6	Capacidade de acidificação .....	43
3.4.1.7	Capacidade de crescimento em diferentes valores de pH.....	43
3.4.1.8	Capacidade de crescimento em diferentes temperaturas .....	43
3.4.1.9	Tolerância ao cloreto de sódio (NaCl) e ao cloreto de sódio associado ao nitrito de sódio (NaNO <sub>2</sub> ).....	44
3.4.1.10	Potencial probiótico .....	44
3.4.1.10.1	Resistência à acidez .....	44
3.4.1.10.2	Tolerância à bile .....	44
3.4.1.11	Atividade antimicrobiana.....	45
3.4.1.12	Identificação bioquímica.....	47
3.4.1.13	Crescimento das cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> 341 (Lp341) e <i>Lactobacillus plantarum</i> 503 (Lp503).....	48
3.4.1.14	Produção de biomassa pelas cepas de bactérias lácticas em caldo MRS.....	48
3.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PÓLEN .....	49
3.6	EXPERIMENTO PARA AVALIAR O EFEITO DAS CULTURAS <i>STARTER</i> DE <i>Lactobacillus plantarum</i> 341 E 503 NA PRODUÇÃO DE SALAMES .....	49
3.6.1	Procedimento Utilizado Para a Elaboração dos Salames .....	50
3.6.2	Condições Utilizadas na Câmara de Maturação Durante a Produção dos Salames .....	51
3.7	ACOMPANHAMENTO DO PROCESSAMENTO DOS SALAMES ELABORADOS COM CULTURAS <i>STARTER</i> DE <i>Lactobacillus plantarum</i> 503 e 341.....	52
3.7.1	Determinação da Cor dos Salames.....	53
3.6.2	Determinação da Perda de Peso dos Salames .....	53
3.6.3	Determinação da Oxidação Lipídica .....	53
3.6.4	Caracterização Físico-Química Após o Processamento .....	53
3.7	AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS SALAMES TIPO ITALIANO PRODUZIDOS COM AS CULTURAS <i>STARTER</i> DE <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> 503 e 341.....	54

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E NA AVALIAÇÃO SENSORIAL .....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE SALAMES ELABORADOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA .....	56
4.1.1 Valores do pH das Amostras de Salames .....	56
4.1.2 Atividade de Água (aw) das Amostras de Salames .....	58
4.1.3 Classificação das Amostras em Relação aos Valores de pH e de Aw .....	58
4.1.4 Teor de Umidade das Amostras de Salames .....	59
4.1.5 Resíduo Mineral Fixo das Amostras de Salames .....	60
4.1.6 Teor de Proteínas das Amostras de Salames .....	60
4.1.7 Relação Umidade/Proteínas das Amostras de Salames .....	61
4.1.8 Teor de Gordura das Amostras de Salames .....	61
4.1.9 Quantidade de Amostras Irregulares em Relação às Características Físico-Químicas Avaliadas .....	62
4.2 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE SALAMES ELABORADOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA .....	63
4.2.1 Quantidade de Bactérias Aeróbias Mesófilos e/ou Facultativas .....	64
4.2.2 Quantidade de Bactérias Lácticas .....	66
4.2.3 Quantidade de <i>Micrococcaceae</i> .....	68
4.2.4 Quantidade de Bolores e Leveduras .....	69
4.2.5 Quantidade de Coliformes Totais, Fecais e <i>Escherichia coli</i> .....	70
4.2.6 <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva .....	71
4.2.7 <i>Salmonella</i> spp. ....	72
4.2.8 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	72
4.2.8 Avaliação Geral da Qualidade Microbiológica das Amostras de Salames .....	75
4.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DAS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SALAMES ELABORADOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA .....	76
4.3.1 Morfologia e Coloração de Gram .....	76
4.3.2 Atividade da Catalase e da Oxidase .....	76
4.3.3 Capacidade de Produzir Gás (CO <sub>2</sub> ) .....	77
4.3.4 Produção de Peróxido de Hidrogênio .....	78
4.3.5 Produção de Dextrana .....	79
4.3.6 Capacidade de Acidificação .....	80
4.3.7 Capacidade de Crescimento em Diferentes Concentrações de Cloreto de Sódio e Nitrito de Sódio .....	81
4.3.8 Capacidade de Crescimento em Diferentes Valores de pH .....	82
4.3.9 Capacidade de Crescimento em Diferentes Temperaturas .....	83
4.3.10 Potencial Probiótico .....	83
4.3.10.1 Resistência à acidez .....	84
4.3.10.2 Tolerância à bile .....	86
4.3.11 Identificação Bioquímica .....	87
4.3.11 Atividade Antimicrobiana Frente a Microrganismos de Importância em Alimentos .....	90
4.4 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DAS CEPAS DE <i>Lactobacillus plantarum</i> 503 E 341 EM CALDO MRS .....	93

4.4 SALAMES ELABORADOS COM AS CEPAS SELECIONADAS DE <i>L.</i>	
<i>plantarum</i> 503 E 341 .....	94
4.4.1 Alterações Microbiológicas dos Salames Ocorridas Durante o Processamento .....	95
4.4.1.1 Bactérias aeróbias mesófilas .....	95
4.4.1.1 Bactérias lácticas .....	96
4.4.1.1 <i>Staphylococcus</i> spp. ....	99
4.4.1.1 Coliformes totais e fecais .....	101
4.4.2 Alterações Físico-Químicas Ocorridas Durante o Processamento dos Salames.....	103
4.4.2.1 Alterações no pH .....	103
4.4.2.2 Alterações na atividade de água .....	106
4.4.2.4 Alterações no peso .....	107
4.4.2.4 Alterações na oxidação lipídica.....	108
4.4.2.4 Alterações na cor .....	112
4.4.3 Qualidade dos Salames .....	113
4.4.3 Avaliação Sensorial dos Salames .....	115
4.4.2.4 Perfil de características .....	115
4.4.2.4 Ordenação de acordo com a preferência .....	118
5 CONCLUSÃO .....	120
REFERÊNCIAS.....	122

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA GERAL DO CATABOLISMO DA GLICOSE PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS .....	24
FIGURA 2 – ESQUEMA GERAL DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS METABÓLICOS IMPORTANTES A PARTIR DO PIRUVATO PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	25
FIGURA 3 – PLACAS UTILIZADAS PARA O TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA TÉCNICA DE DIFUSÃO POR CAVIDADE .....	46
FIGURA 4 – PLACA COM <i>Listeria monocytogenes</i> E OS DISCOS DE MRSA COM AS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS .....	46
FIGURA 5 – GALERIAS DO SISTEMA DE IDENTIFICAÇÃO API 50 CHL .....	47
FIGURA 6 – SALAMES ACONDICIONADOS NA CÂMARA DE MATURAÇÃO DURANTE O PROCESSAMENTO .....	51
FIGURA 7 – (A) QUANTIDADE DE AMOSTRAS IRREGULARES EM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS $a_w$ , UMIDADE, PROTEÍNAS E GORDURA; (B) QUANTIDADE DE AMOSTRAS EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS IRREGULARES.....	62
FIGURA 8 – FORMAÇÃO DE HALO AO REDOR DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DEVIDO À PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....	78
FIGURA 9 – PRESENÇA DE CÁPSULA AO REDOR DE CÉLULAS DE <i>Lactobacillus plantarum</i> 503.....	79
FIGURA 10 – RESULTADOS DOS TESTES DE VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE 45 CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM RELAÇÃO À RESISTÊNCIA À ACIDEZ E À TOLERÂNCIA AOS SAIS BILIARES.....	85
FIGURA 11 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TESTE COM OS DISCOS DE ÁGAR MRS CONTENDO AS DIFERENTES CULTURAS DE <i>Lactobacillus</i> ISOLADAS DOS SALAMES FRENTE À CEPA DE <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	91
FIGURA 12 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TESTE COM OS DISCOS DE ÁGAR MRS CONTENDO AS DIFERENTES CULTURAS DE <i>Lactobacillus</i> ISOLADAS DOS SALAMES FRENTE À CEPA DE <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111 .....	92
FIGURA 13 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TESTE COM OS DISCOS DE ÁGAR MRS CONTENDO AS DIFERENTES CULTURAS DE <i>Lactobacillus</i> ISOLADAS DOS SALAMES FRENTE À CEPA DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	92
FIGURA 14 – CURVA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS DE <i>lactobacillus</i> . <i>plantarum</i> 503 E 341 QUANDO CULTIVADAS EM CALDO MRS. ....	94
FIGURA 15 – PARTIDAS DE SALAMES PRODUZIDAS PARA AVALIAR O EFEITO DAS CULTURAS <i>STARTER</i> SELECIONADAS.....	95



FIGURA 16 – EVOLUÇÃO NA QUANTIDADE DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES.....	96
FIGURA 17 – EVOLUÇÃO NA QUANTIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES .....	97
FIGURA 18 – EVOLUÇÃO NA QUANTIDADE DE <i>Staphylococcus</i> COAGULASE NEGATIVA DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES.....	100
FIGURA 19 – EVOLUÇÃO NA QUANTIDADE DE COLIFORMES TOTAIS DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES .....	102
FIGURA 20 – ALTERAÇÕES NO VALOR DO pH DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES....	104
FIGURA 21 – ALTERAÇÕES NO VALOR DA ATIVIDADE DE ÁGUA DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES .....	106
FIGURA 22 – PERDA DE PESO DOS SALAMES DURANTE O PROCESSAMENTO .....	108
FIGURA 23 – ALTERAÇÕES NO VALOR DO TBARS DURANTE O PROCESSAMENTO E O ARMAZENAMENTO NAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES.....	109
FIGURA 24 – PERFIL DAS CARACTERÍSTICAS DOS SALAMES .....	118

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS ESTABELECIDAS PARA OS PRODUTOS DENOMINADOS DE “SALAME” E “SALAME TIPO ITALIANO” .....	18
TABELA 2 – PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA SALAMES .....	19
TABELA 3 – CONDIÇÕES UTILIZADAS NA CÂMARA CLIMATIZADA DURANTE A PRODUÇÃO DOS SALAMES TIPO ITALIANO .....	52
TABELA 4 – VALORES MÉDIOS DE pH, aw, UMIDADE, CINZAS, LIPÍDEOS, PROTEÍNAS E RELAÇÃO UMIDADE/PROTEÍNA DE CINQUENTA AMOSTRAS DE SALAMES PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA .....	57
TABELA 5 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE 50 AMOSTRAS DE SALAMES ELABORADOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA .....	65
TABELA 6 – RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO DOS LACTOBACILOS SELECIONADOS DE ACORDO COM O PERFIL BIOQUÍMICO APRESENTADO .....	88
TABELA 7 – VALORES MÉDIOS DA LUMINOSIDADE (L*), COR VERMELHA (a*) E COR AMARELA (b*) DOS SALAMES NO FINAL DO PROCESSAMENTO E DURANTE O ARMAZENAMENTO .....	112
TABELA 8 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS SALAMES NO FINAL DO PROCESSAMENTO (14º DIA) .....	114
TABELA 9 – VALORES MÉDIOS ATRIBUÍDOS PELOS JULGADORES NO TESTE DO PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DOS SALAMES .....	115

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – FORMULAÇÃO PADRÃO DE SALAME TIPO ITALIANO UTILIZADA PARA TESTAR AS CEPAS DE <i>Lactobacillus plantarum</i> 341 E 503.....	49
QUADRO 2 – PARTIDAS DE SALAMES PRODUZIDAS PARA TESTAR AS CEPAS DE <i>Lactobacillus plantarum</i> 503 E 341 E O POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE PÓLEN.....	50
QUADRO 3 – FICHA UTILIZADA NA AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS AMOSTRAS DE SALAMES.....	55
QUADRO 4 – CARACTERÍSTICA DAS CEPAS TÍPICAS DE <i>Listeria</i> ISOLADAS DE DIFERENTES AMOSTRAS DE SALAMES .....	73
QUADRO 5 – PERFIL BIOQUÍMICO DE 10 CEPAS DE LACTOBACILOS AVALIADAS .....	89
QUADRO 6 – RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TESTE COM OS DISCOS DE ÁGAR MRS CONTENDO AS DIFERENTES CULTURAS DE <i>Lactobacillus</i> ISOLADAS DOS SALAMES.....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALOA	Ágar <i>Listeria</i> Ottavani e Agosti
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
aw	Atividade de água
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitoluenol
BP	Ágar Baird Parker
BS	Ágar Bismuto Sulfito
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CV	Coefficiente de Variação
DRBC	Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
EC - MUG	Caldo <i>Escherichia coli</i> com 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HE	Ágar Entérico de Hectoen
LIA	Ágar Ferro Lisina
M	Média
MRS	Ágar Man, Rogosa e Sharpe
MSA	Ágar Mannitol Salt
NaCl	Cloreto de Sódio
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de Sódio
NaNO <sub>3</sub>	Nitrato
nm	Nanometros
NMP	Número Mais Provável
PBS	Tampão Fosfato Salina
PCA	Ágar Padrão para Contagem
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
SC	Caldo Selenito Cistina
SIM	Ágar Sulfeto Indol Motilidade
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico
TBHQ	t-butilhidroquinona
TSA	Ágar Soja Trypticase
TSB	Caldo Trypticase de Soja
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
TT	Caldo Tetracionato
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VB	Caldo Verde Brilhante Bile
XLD	Ágar Xilose Lisina Desoxicolato
YE	Extrato de Levedura

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade de salames artesanais elaborados por fermentação espontânea, bem como isolar, caracterizar e selecionar cepas de bactérias lácticas de sua microbiota, com características tecnológicas adequadas para a utilização como culturas *starter* na produção de salame tipo italiano. Verificou-se uma grande variação nas características físico-químicas dos salames artesanais avaliados, obtidos por fermentação espontânea: pH de 4,35 a 6,92; atividade de água de 0,80 a 0,95; umidade de 20,97% a 55,11%; proteínas de 11,32% a 41,27% e gordura de 7,44% a 48,83%. Estes produtos também apresentaram uma população microbiana variável, com as seguintes concentrações: bactérias aeróbias mesófilas de 5,0 a 8,48 log UFC.g<sup>-1</sup>; bactérias lácticas de 4,0 a 8,35 log UFC.g<sup>-1</sup>; *Micrococcaceae* de 3,0 a 7,8 log UFC.g<sup>-1</sup>; bolores e leveduras de 2,0 a 6,81 log UFC.g<sup>-1</sup>. A presença de coliformes fecais foi confirmada em 38% das amostras, *Staphylococcus* coagulase positiva em 30% e *Listeria monocytogenes* foi isolada de 8% das amostras. Não foi verificada a presença de *Salmonella* nas amostras de salames elaborados por fermentação espontânea. Na avaliação das características tecnológicas das 50 cepas de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais, obtidos por fermentação espontânea, 50% produziram peróxido de hidrogênio, 66% sintetizaram dextrana a partir de sacarose e 2% produziram gás a partir da glicose. A capacidade de acidificação foi variável com valores de pH entre 3,56 e 4,52. Todas as cepas foram capazes de crescer em 3%, 5% e 8% de cloreto de sódio, sendo que 2% não se desenvolveram na presença de 200 ppm de nitrito de sódio. Todas as cepas cresceram em caldo com pH 4 e 5, porém 10% não se desenvolveram em pH 3. Foi verificado o potencial probiótico em relação à resistência à acidez por 96% das cepas avaliadas e 100% foram tolerantes aos sais biliares. Das dez cepas de bactérias lácticas que apresentaram as melhores características tecnológicas para a utilização como culturas *starter* em salames, nove foram identificadas bioquimicamente como *Lactobacillus plantarum* e uma como *Lactobacillus* sp. Essas cepas apresentaram atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Os salames elaborados com as culturas *starter* de *Lactobacillus plantarum* 503 e *Lactobacillus plantarum* 341, selecionadas de salames artesanais, apresentaram contagem de bactérias lácticas acima de 8 log UFC.g<sup>-1</sup>; a quantidade de coliformes totais foi inferior a 1 log UFC.g<sup>-1</sup>. A população de *Staphylococcus* spp. foi superior a 6 log UFC.g<sup>-1</sup> no tratamento controle, já nos salames elaborados com as culturas *starter* selecionadas a quantidade foi inferior a 3 log UFC.g<sup>-1</sup>, sendo que não foi verificada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva para todos os tratamentos. Os valores de atividade de água, umidade, proteínas e gorduras apresentaram-se dentro do estabelecido pelo regulamento para salame tipo italiano. A utilização de extrato de pólen apícola na elaboração de salame, como antioxidante natural, ocasionou uma redução na quantidade de malonaldeído, demonstrando atividade antioxidante. Na avaliação sensorial e no teste de preferência, não foram verificadas diferenças significativas entre os salames dos diferentes tratamentos.

Palavras-chave: salame; *starter*; microbiota; características físico-químicas.

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the quality of artisanal sausages obtained by spontaneous fermentation as well as to isolate, to characterize, and to select strains of lactic acid bacteria of its microbiota, with adequate technological characteristics to the use of starter cultures in the production of Italian type sausages. It was verified a great variation of physico-chemical characteristics of the evaluated artisanal sausages, obtained by spontaneous fermentation: pH from 4,35 to 6,92; water activity from 0,80 to 0,95; humidity from 20,97 to 55,11%; protein from 11,32 to 41,27% and fat from 7,44 to 48,83%. These products also presented a variable microbial population with the following concentrations: aerobic mesophilic bacteria from 5,0 to 8,48 log UFC.g<sup>-1</sup>; lactic bacteria from 4,0 to 8,35 log UFC.g<sup>-1</sup>; *Micrococcaceae* from 3,0 to 7,8 log UFC.g<sup>-1</sup> and; mold and yeast from 2,0 to 6,81 log UFC.g<sup>-1</sup>. Fecal coliforms were confirmed in 38% of the samples, coagulase-positive *Staphylococcus* in 30% and *Listeria monocytogenes* was isolated in 8% of the samples. The presence of *Salmonella* was not verified in spontaneous fermentation sausages. In the evaluation of the technological characteristics, from the 50 evaluated strains of lactic bacteria isolated from artisanal sausages, obtained by spontaneous fermentation, 50% produced hydrogen peroxide, 66% produced dextran from saccharose, and 2% produced gas from glucose. The acidification capacity was variable with pH values between 3,56 and 4,52. All strains were capable to grow in 3%, 5% and 8% of sodium chloride; being 2 % not developed in the presence of 200 ppm of sodium nitrite. All strains were grown on broth with pH 4 and 5, however, 10% did not develop at pH 3. It was verified the probiotic potential in relation to the resistance to acidity in 96% of the evaluated strains and 100 % of tolerance to biliary salts. From the ten strains of lactic bacteria which presented the best technological characteristics for the use as starter cultures in sausages, nine were biochemically identified as *Lactobacillus plantarum* and one as *Lactobacillus sp.* These strains presented antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The sausages elaborated with the starter cultures of *Lactobacillus plantarum* 503 and *Lactobacillus plantarum* 341, selected of artisanal sausages, presented counting and lactic bacteria above 8 log UFC.g<sup>-1</sup>; the amount of the total coliforms was lower than 01 log UFC.g<sup>-1</sup>. The *Staphylococcus* spp. population was higher than 6 log UFC.g<sup>-1</sup> in the control treatment; even though in the elaborated sausages with selected starter the quantity was lower than 3 log UFC.g<sup>-1</sup>; and it was not verified the presence of coagulase-positive *Staphylococcus* in all the treatments. The values of water activity, humidity, proteins and fats are in accordance with the regulation for the Italian type sausage. The use of bee pollen extract in the sausage production, as natural antioxidant, occasioned a reduction in the amount of malonaldehyde, demonstrating antioxidant activity. No significant differences were verified in terms of sensorial evaluation and preference test among the sausages of different treatments.

Key words: sausages; starter; microbiota; physico-chemical characteristics

## 1 INTRODUÇÃO

A carne é uma importante fonte de proteína de altíssimo valor biológico na alimentação humana. Os produtos cárneos requerem cuidados especiais de armazenamento devido à fácil degradação microbiológica. Essa deterioração está associada com as características intrínsecas desses produtos, tais como a alta atividade de água ( $A_w$ ), pH elevado, disponibilidade de nutrientes, fatores de crescimento e de minerais, condições adequadas para o ótimo crescimento dos microrganismos (HAMMES; BANTLEON; MIN, 1990).

A industrialização da carne tem como objetivo aumentar a vida-de-prateleira, desenvolver diferentes sabores, e utilizar partes da carcaça de difícil comercialização e de alguns subprodutos, como o sangue, o bucho, o fígado e a pele que são facilmente comercializáveis somente quando participantes da formulação de produtos cárneos (TERRA, 1998).

A fermentação é um dos métodos mais antigos de transformação e conservação de alimentos utilizados pelo homem (HANSEN, 2002). Os embutidos cárneos fermentados caracterizam-se pelo seu baixo teor de umidade e conseqüentemente baixa  $A_w$ , e pela presença de ácido láctico em concentração que confere ao produto um sabor característico e agradável. O processamento desses produtos tem como princípio básico a utilização de métodos combinados de preservação, permitindo a obtenção de um produto estável a temperatura ambiente (HUGAS, MONFORT, 1997; TERRA 1998; FRANCO et al., 2002).

A fabricação de salames inicia-se com a mistura dos ingredientes seguida pela fermentação e por último a desidratação. A etapa da fermentação ocupa posição de alta relevância, fase onde ocorre a diminuição do pH e o desenvolvimento das características sensoriais do salame. Na fase final ocorre a desidratação, que além de reforçar as propriedades sensoriais, reduz a atividade da água em níveis impróprios para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos ou responsáveis pela deterioração do produto (BUCKENHÜSKES, 1993; MONTEL; MASSON; TALON, 1998; TERRA, 1998; FERNÁNDEZ et al., 2000).

Atualmente, no Brasil existe um grande número de pequenas indústrias que produzem salames de forma artesanal. Esses produtos são fabricados de forma empírica, sem a adição de culturas *starter* e com inúmeras variações de condimentos e das condições de processamento, que dependem da região onde é fabricado. Na literatura são escassos os estudos que investigam as características e a qualidade desses produtos, tanto em relação a parâmetros físico-químicos quanto à sua microbiota.

A fermentação desses salames é realizada pela ação da microbiota nativa, composta principalmente por bactérias lácticas e espécies da família *Micrococcaceae*. Esses microrganismos são provenientes da matéria-prima utilizada, dos ingredientes, bem como do ambiente de processamento (LEBERT et al., 2007). Porém, a elaboração de salames por fermentação espontânea pode causar uma grande variação na qualidade final dos produtos, em relação a suas características sensoriais, aspectos higiênicos e de segurança alimentar (HOLZAPFEL, 2002). Dessa forma, a utilização de culturas *starter* e de condições controladas na fabricação de salames permitem um alto grau no controle do processo fermentativo resultando em um produto padronizado (LEROY; De VUYST, 2004).

As bactérias lácticas são muito utilizadas em fermentações para preservar a qualidade nutritiva de vários alimentos. Em salames, esse grupo de microrganismo é predominante durante o processamento e devido à sua atividade metabólica contribui com a qualidade final do produto e com sua segurança. O primeiro efeito antimicrobiano exercido pelas bactérias lácticas é a produção de ácido láctico e a conseqüente queda do pH, além disso, elas também podem produzir vários compostos antimicrobianos como peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil e bacteriocinas. Estas substâncias podem apresentar ação antagônica ao crescimento de espécies microbianas deteriorantes e patogênicas em alimentos (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; LÜCKE, 2000).

A biodiversidade dos *starter* comerciais é limitada. Sendo assim, a seleção e o desenvolvimento de novas culturas *starter*, a partir da microbiota nativa de salames obtidos por fermentação espontânea e a sua utilização no processamento, pode proporcionar a obtenção de produtos com boa qualidade higiênico-sanitária, bem como



a obtenção de produtos regionais típicos com características sensoriais específicas (TALON; LEROY; LEBERT, 2007). Salienta-se o fato de que na atualidade a totalidade das indústrias cárneas brasileiras utilizam *starter* importado.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade de salames artesanais e selecionar culturas *starter* de sua microbiota para produção de salame tipo italiano.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as características físico-químicas de salames produzidos por fermentação espontânea fabricados por pequenas indústrias cárneas do sul do Brasil;
- Avaliar se as amostras de salames atendem aos requisitos mínimos de qualidade de salame, estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Quantificar os principais grupos ou espécies de microrganismos pertencentes à microbiota das amostras de salames;
- Avaliar se as amostras de salames atendem aos Padrões Microbiológicos para Alimentos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
- Isolar, caracterizar e identificar cepas de bactérias lácticas de amostras de salames obtidos por fermentação espontânea.
- Selecionar estirpes com características tecnológicas apropriadas para a utilização como culturas *starter* na fabricação de salames;
- Produzir salame tipo italiano com culturas *starter* selecionadas da microbiota de salames produzidos por fermentação espontânea;
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato de pólen durante o processamento e armazenamento dos salames;

- Caracterizar os salames produzidos com as culturas *starter* selecionadas da microbiota nativa quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos;
- Avaliar a aceitação sensorial dos salames produzidos com as culturas *starter* selecionadas da microbiota nativa.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ALIMENTOS FERMENTADOS

Os alimentos fermentados são definidos como produtos preparados a partir de matérias-primas cruas ou aquecidas, que adquirem características peculiares, por um processo onde os microrganismos estão envolvidos. Em alguns casos, as enzimas endógenas de matérias-primas cruas possuem um papel decisivo no processo de transformação (BUCKENHÜSKES, 1993).

A fermentação de alimentos vem sendo utilizada por séculos como um método de preservação de produtos perecíveis. As matérias-primas utilizadas tradicionalmente para a fermentação são muitas, tais como frutas, cereais, mel, vegetais, leite, carnes e peixes. A fermentação permite obter uma grande variedade de diferentes produtos pela utilização de diversas matérias-primas, culturas *starter* e condições de fermentação (HANSEN, 2002).

A produção de alimentos por fermentação parece ter seu início no Oriente e datam do período pré-histórico. Esse método é considerado uma das mais antiga tecnologia conhecida pelo homem utilizada para produzir alimentos. Desde o início da civilização existem registros da fermentação de leites, carnes e vegetais, sendo que os primeiros registros datam de 6000 anos a.C. (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; HOLZAPFEL, 2002).

Obviamente que esses processos fermentativos ocorriam de forma natural e que o papel dos microrganismos não era conhecido. No entanto, a forma de manusear e armazenar em condições específicas certas matérias-primas resultava no desenvolvimento de alimentos com características sensoriais apreciadas. Na maioria dos casos, essas técnicas eram passadas de geração a geração em comunidades locais, monastérios e feudos (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Inicialmente, os processos de fermentação eram, principalmente, utilizados para preservar alimentos de origem vegetal e animal. Porém, com o surgimento de outros processos de preservação, como a esterilização e a utilização da cadeia do frio,

a fermentação perdeu sua importância como método de conservação nos países industrializados (BUCKENHÜSKES, 1993).

Com o passar do tempo, os processos fermentativos foram melhorados e diversificados. Uma grande variedade de alimentos fermentados é produzida, tanto em países industrializados como nos países em desenvolvimento, em nível doméstico, em pequenas fábricas ou por grandes indústrias (MOTARJEMI, 2002). Dessa forma, a fermentação se tornou mais que um método de conservação, destacando-se como uma importante tecnologia utilizada para produzir alimentos com características peculiares. Os alimentos fermentados formam uma classe independente de gêneros alimentícios, com grande aceitação pelos consumidores, por apresentarem características de *flavour*, aroma e textura muito apreciados (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Outra característica importante da fermentação é o aumento da quantidade de nutrientes e da qualidade dos alimentos. Isso ocorre devido à biossíntese de vitaminas, aminoácidos essenciais e proteínas, pelo aumento da biodisponibilidade de micronutrientes e pela degradação de substâncias antinutricionais presentes na matéria-prima (GIRAFFA, 2004).

Os processos de fermentação também aumentam a segurança alimentar pela degradação de compostos tóxicos como aflatoxinas e cianogênio ou pela produção de substâncias antimicrobianas, tais como ácido láctico, bacteriocinas, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio e etanol, que auxiliam na inibição ou eliminação de microrganismos patogênicos associados aos alimentos (HOLZAPFEL, 2002; MOTARJEMI, 2002; LEROY; De VUYST, 2004).

Em geral, todas as classes de microrganismos são usadas na fermentação de alimentos, porém as bactérias e as leveduras são mais utilizadas que os bolores. Entre as bactérias, o grupo das ácido-lácticas são as mais importantes (BUCKENHÜSKES, 1993). Estes microrganismos causam a rápida acidificação da matéria-prima, pela produção de ácidos orgânicos. Também produzem etanol, bacteriocinas, compostos aromáticos, exopolissacarídeos e muitas enzimas. Sendo assim, a atividade metabólica das bactérias lácticas aumenta a vida-de-prateleira e a segurança alimentar, melhora a

textura e contribui na formação do perfil sensorial do produto final (LEROY; De VUYST, 2004).

Alguns processos de produção utilizam a fermentação espontânea, onde a microbiota natural da matéria-prima e contaminantes ambientais são os responsáveis pelas transformações. Por outro lado, várias indústrias adicionam culturas *starter* selecionadas, isso diminui o tempo de produção e possibilita obter produtos mais seguros ao consumidor, com características e qualidade constantes (LÜCKE, 2000).

Nas últimas décadas, o consumo de produtos fermentados teve um grande aumento, entre os quais destacam-se aqueles derivados do leite, salames, bebidas alcoólicas, vegetais, molhos, bem como de produtos étnicos como o kefir. Uma das razões para o incremento no consumo de alimentos fermentados é devido ao fato que os consumidores consideram esses produtos saudáveis e naturais (GIRAFFA, 2004).

Na Alemanha, aproximadamente 25% das provisões consumidas são produtos fermentados (BUCKENHÜSKES, 1993), entre os quais destacam-se os salames, onde são produzidos em torno de 330 tipos diferentes (HAMMES; BANTLEON; MIN, 1990). Na Itália, a diversificação do salame é ainda maior, atingindo em torno de mil variedades. Todos esses produtos são estáveis a temperatura ambiente devido ao baixo pH e  $A_w$  (TERRA, 1998).

## 2.2 SALAMES

A industrialização e o processamento de carnes consiste na transformação das carnes em produtos cárneos, sendo que as provenientes de bovinos, suínos e aves são as preferencialmente utilizadas pelas indústrias como matérias-primas. Entre os mais variados produtos obtidos pela industrialização da carne destacam-se as linguiças, mortadela, salsicha, apresuntado, presunto, hambúrguer, charque e salames (TERRA, 1998).

A carne e os produtos cárneos representam uma parte importante da dieta humana. A origem da produção de salames fermentados, curados e secos datam dos tempos babilônicos, quando métodos como a secagem, a salga e a fermentação já estavam em uso (FRANCO et al., 2002). A fermentação é um método simples e barato

de preservação de produtos cárneos, com a vantagem de criar produtos característicos e com excelente aroma (SAKHARE; RAO, 2003).

Na Europa, existe uma grande variedade de salames fermentados, sendo que muitos deles são produtos típicos característicos de determinados países, regiões ou localidades (AMBROSIADIS et al., 2004; MORETTI et al., 2004; COMI et al., 2005; SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005; TALON; LEROY; LEBERT, 2007). A produção e o consumo *per capita* são maiores na Alemanha, Itália, Espanha e França, entretanto esses produtos estão se tornando cada vez mais populares em países onde são conhecidos há menos tempo, como nos Estados Unidos, Austrália, Grã Bretanha, Japão e Brasil (FERNÁNDEZ et al., 2000).

Internacionalmente, os salames são classificados em dois grandes grupos de acordo com a tecnologia de fabricação utilizada e o pH final do produto. Os salames do norte são elaborados com carne bovina e suína, são mais ácidos, apresentando valores de pH inferiores a 5,0. Já os produzidos no Mediterrâneo são elaborados geralmente a partir de carne suína e os valores de pH são sempre superiores a 5,0 (TERRA, 1998; TALON; LEROY; LEBERT, 2007). O salame tipo italiano elaborado no Brasil é semelhante ao produzido no Mediterrâneo, pois é obtido a partir de carne suína, maturado por aproximadamente 30 dias e com pH final em torno de 5,4 (TERRA, 2003).

Apesar da grande variedade de salames existente, esses produtos podem ser definidos como produtos cárneos elaborados pela mistura de carne picada (moída), pedaços de gordura, sal, agentes de cura, açúcar e temperos, embutidos em envoltório e submetido à fermentação e posterior secagem (HUGAS; MONFORT, 1997; FERNÁNDEZ et al., 2000). Os salames são estáveis a temperatura ambiente e comumente consumidos sem aquecimento (HAMMES; BANTLEON; MIN, 1990).

Os principais microrganismos envolvidos durante a etapa da fermentação dos salames pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas. Esses microrganismos são dominantes e responsáveis pela rápida fermentação dos carboidratos adicionados à mistura cárnea, levando a diminuição do pH, pelo acúmulo de ácidos orgânicos, principalmente do ácido láctico. A acidificação tem um efeito muito positivo durante o

processamento, sendo que a redução do pH deixa as proteínas musculares abaixo de seu ponto isoelétrico, reduzido a capacidade de retenção de água pela carne. Este fato é muito importante, pois auxilia o processo de desidratação do salame durante a maturação, com conseqüente redução na  $A_w$  (MIRALLES; FLORES; PEREZ-MARTINEZ, 1996). Salienta-se também que a acidificação responde pela passagem das proteínas do estado sol para o estado gel, indispensável para o correto fatiamento do salame sem a ocorrência da desintegração das fatias (TERRA, 1998).

Os salames possuem uma longa vida-de-prateleira, isso ocorre devido ao baixo pH que causa distúrbios na homeostase das células dos microrganismos patogênicos e deteriorantes (URSO et al., 2006). Além do baixo pH, os valores baixos da  $A_w$ , juntamente com a presença de concentrações moderadas de cloreto de sódio (em torno de 3%) e de outros aditivos, geram uma condição ambiental muito seletiva ao desenvolvimento microbiano na massa cárnea (MIRALLES; FLORES; PEREZ-MARTINEZ, 1996; GARCÍA-VARONA et al., 2000). Cabe ressaltar que várias espécies de bactérias lácticas possuem a capacidade de produzir bacteriocinas. Estas substâncias são ativas frente a vários microrganismos e também contribuem com a segurança e estabilidade microbiológicas dos salames fermentados (O'SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002).

A atividade metabólica das bactérias lácticas contribui com a qualidade final do produto. A redução do pH cria condições para que ocorram reações responsáveis pela formação da coloração típica dos salames, e também leva à coagulação das proteínas solúveis contribuindo com a formação da textura característica dos salames (GARCÍA-VARONA et al., 2000). O catabolismo dos carboidratos, as atividades proteolítica e lipolítica durante o processamento também contribuem com o desenvolvimento do *flavour* característicos dos salames (MONTEL; MASSON; TALON, 1998).

O tipo da microbiota que se desenvolve em salames tradicionais, sem a adição de culturas *starter*, está relacionado com a diversidade de formulações e com as práticas de fermentação e maturação utilizadas (TALON; LEROY; LEBERT, 2007). As bactérias lácticas predominantes em salames pertencem ao gênero *Lactobacillus* e

entre as mais freqüentemente isoladas estão o *L. curvatus*, *L. sakei* e *L. plantarum* (SAMELIS; MAUROGENAKIS; METAXOPOULOS, 1994; SANTOS et al., 1998; COPPOLA et al., 2000; COMI et al., 2005; DROSINOS et al., 2005).

Bactérias da família *Micrococcaceae* também fazem parte da microbiota responsável pelas transformações benéficas que ocorrem durante a produção de salames. Esses microrganismos são importantes devido às suas características metabólicas, como atividade lipolítica, proteolítica e redução do nitrato, que contribuem com a formação da cor e do *flavour* dos salames (MIRALLES; FLORES; PEREZ-MARTINEZ, 1996; SONDERGAARD; STAHNKE, 2001).

Na elaboração de salames, a redução do nitrato a nitrito é uma etapa fundamental para o desenvolvimento da coloração, reação que é catalisada pela enzima nitrato redutase, produzida por membros da família *Micrococcaceae*. O nitrito posteriormente é transformado por uma série de reações a óxido nitroso que reage com a mioglobina formando o complexo nitrosomioglobina responsável pela coloração típica dos produtos curados (MAURIELLO; CASABURI; VILLANI, 2004).

O nitrito adicionado na massa cárnea ou originado a partir do nitrato limita a oxidação lipídica, que ocorre por três mecanismos indiretos: a) liga-se ao ferro heme e previne a liberação do íon ferro, b) liga-se ao ferro livre e assim inibe sua ação catalítica c) estabiliza lipídeos saturados evitando a oxidação (MAURIELLO; CASABURI; VILLANI, 2004).

A proteólise e a lipólise ocasionadas por enzimas endógenas, ou devido ao metabolismo das *Micrococcaceae*, liberam várias substâncias aromáticas e ácidos orgânicos. Assim, o catabolismo de proteínas e gorduras influencia tanto no desenvolvimento da textura como do *flavour*, devido à formação de compostos de baixo peso molecular, incluindo peptídeos, aminoácidos, aldeídos, aminas e ácidos graxos livres, que são importantes componentes do *flavour* ou precursores destas moléculas (HUGAS; MONFORT, 1997; MONTEL; MASSON; TALON, 1998; MAURIELLO; CASABURI; VILLANI, 2004).

Em vários estudos de caracterização de produtos cárneos fermentados obtidos por fermentação espontânea foi verificado a predominância de *Staphylococcus* sobre



outros integrantes da família *Micrococcaceae*. As espécies *S. saprophyticus*, *S. xylosus* e *S. carnosus* são predominantes, sendo que as duas últimas são componentes de culturas *starter* utilizadas na elaboração de produtos cárneos fermentados, pois as reações metabólicas produzidas durante o seu desenvolvimento contribuem na formação do *flavour* e da coloração dos produtos (MIRALLES; FLORES; PREZ-MARTINEZ 1996; COPPOLA et al., 2000; GARCÍA-VARONA et al., 2000; PAPAMANOLI et al., 2002; MAURIELLO; CASABURI; VILLANI, 2004; CASABURI et al., 2005). A capacidade de produzir compostos antimicrobianos aumenta o interesse da utilização desses microrganismos em alimentos, pois podem reduzir a deterioração e inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, como a *Listeria monocytogenes* (PAPAMANOLI et al., 2002).

As grandes indústrias de carnes necessitam assegurar alta qualidade, pouca variabilidade e realçar as características sensoriais na produção de salames, que não é possível utilizando o método de fermentação espontânea na elaboração dos salames. Entretanto, as culturas *starter* desenvolvidas nos últimos cinquenta anos têm reduzido o tempo de fermentação, garantido baixas concentrações de nitrato e nitrito no produto final e padronizado as características sensoriais (HUGAS; MONFORT, 1997).

As bactérias lácticas comumente utilizadas como culturas *starter* na elaboração de salames provêm das espécies *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentosaceus*. As culturas *starter* também podem incluir cocos Gram positivos e catalase positivos, entre os quais estão *Kocuria varians*, *Staphylococcus carnosus* subespécie *carnosus* e *utilis* e *Staphylococcus xylosus*, porém esses não são sistematicamente utilizados na elaboração de salames (LÓPEZ et al., 2006).

## 2.2.1 Matérias-Primas e Ingredientes Utilizados na Elaboração de Salames

### 2.2.1.1 Carnes

Tradicionalmente, as carnes utilizadas na elaboração de embutidos fermentados são provenientes de suínos e bovinos (TERRA, 1998). Porém, carnes de

várias outras espécies são objetos de estudos para verificar a possibilidade de utilização na elaboração de embutidos fermentados. Esses estudos visam o desenvolvimento de novos produtos, com características peculiares, bem como agregar valor às carnes de espécies de animais típicos de determinadas regiões ou etnias, ou mesmo de espécies silvestres produzidas de forma legal (CARIONI et al., 2001; NASSU; GONÇALVES; BESERRA, 2002; PALEARI et al., 2002; SACHINDRA et al., 2004; SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005; AHMAD; SRIVASTAVA, 2007).

Alguns tipos de salames fermentados, característicos de determinadas regiões, são elaborados a partir de matéria-prima proveniente de uma raça específica, criada sob condições definidas de alimentação e manejo. Um exemplo disso é o caso do salame Siciliano (MORETTI et al., 2004). Também determinados tipos de salames podem ser elaborados a partir de carnes provenientes de partes específicas do animal (LORENZO et al., 2000). As características finais peculiares dos salames dependem também do tipo e qualidade da carne utilizada. Cabe ressaltar que as condições de transporte e o manejo antes do abate igualmente podem interferir na qualidade da carne e conseqüentemente nas características finais do produto (TERRA, 1998).

Não é fácil padronizar a composição química da carne, já que existem muitas diferenças devido a fatores como a espécie, a raça, o sexo, a idade, o tipo de alimentação e o corte analisado. Os componentes majoritários da carne são a água (65%-80%), as proteínas (16%-22%), a gordura (3%-13%) e as cinzas (ORDÓÑEZ et al., 2005).

As proteínas da carne são os constituintes mais importantes dos salames, tanto pelo valor nutricional como pelas suas propriedades tecnológicas. As proteínas são os principais componentes funcionais e estruturais de carnes processadas. Entre suas propriedades estão a solubilidade, viscosidade, ligação com a água e gorduras, coagulação e emulsificação (IBAÑEZ et al., 1997).

A degradação das proteínas em peptídeos e aminoácidos, durante o processamento dos salames, provoca alterações benéficas, contribuindo com a formação do *flavour* característico do produto final (MONTEL; MASSON; TALON,

1998). Entretanto, a descarboxilação dos aminoácidos pode levar a formação de aminas biogênicas. Essas moléculas são geralmente psicoativas (dopamina, serotonina) ou vasoativas (triptamina, histamina). Além disso, aminas biogênicas como as cadaverinas e putrescinas são tidas como precursoras de nitrosaminas carcinogênicas (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2003).

#### 2.2.1.2 Gordura

Entre os componentes básicos da carne, o mais variável, tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo é a gordura. A gordura se acumula principalmente em cavidade corporal, região subcutânea e inter e intramuscular. Além do papel fisiológico, a distribuição de gordura e o conteúdo relativo a vários ácidos graxos têm importância em relação a fatores relacionados com a palatabilidade (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A gordura é um componente utilizado na elaboração de salames, sendo presente na carne ou pela utilização de gordura dorsal (toucinho). Durante o processamento e o armazenamento, uma das mais significativas alterações que ocorrem na fração lipídica é a hidrólise dos triglicerídios pelas lipases liberando ácidos graxos livres, que são muito importantes na formação do *flavour* característico desses produtos (ZALACAIN et al., 1995)

Organizações ligadas à saúde pública têm adotado políticas que estimulam as pessoas na escolha de uma alimentação mais saudável, pela redução da quantidade de calorias ingeridas, de gorduras saturadas e de colesterol, com o objetivo de prevenir doenças cardiovasculares (VALSTA; TAPANAINEN; MÄNNIATÖ, 2005). Entretanto, a gordura é um componente com função tecnológica importante na produção de salames, atua como um reservatório para componentes do *flavour*, e contribui com a textura e suculência do produto. Dessa forma, a quantidade e a qualidade da gordura adicionada nos salames podem alterar a qualidade do produto (SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005; AHMAD; SRIVASTAVA, 2007).

As gorduras presentes nas matérias-primas utilizadas na fabricação de salames, além da importante função tecnológica de contribuir com a formação das características finais, também podem determinar a vida-de-prateleira do produto. A rancificação das gorduras leva à formação de compostos que produzem alterações no *flavour* do produto, conferindo sabor típico de ranço. A rancificação também pode provocar o escurecimento dos salames (TERRA, 1998). BOZKURT; ERKMEN (2002) citam que além da diminuição da vida-de-prateleira, a oxidação lipídica leva a formação de substâncias prejudiciais à saúde, como o malonaldeído capaz de causar mutações e câncer.

#### 2.2.1.3 Ingredientes de cura

MACEDO (2005) cita que inicialmente a cura constituía da adição de sal à carne para fins de conservação. Entretanto, no decorrer do tempo outras substâncias foram adicionadas. Sendo que cada ingrediente desempenha um papel importante no processo de cura. Essas substâncias contribuem com a estabilização microbiológica e com a segurança alimentar, bem como com o desenvolvimento das características sensoriais do produto final (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O sal é o componente básico de todas as misturas de cura, sendo o único absolutamente necessário. Esse ingrediente desempenha diversas funções tecnológicas na elaboração dos salames. A adição de NaCl contribui para a diminuição da *Aw* e também provoca modificações na pressão osmótica, que juntamente com a ação tóxica do íon cloro dificulta o desenvolvimento de determinados grupos de microrganismos. O sal também facilita a extração e a solubilização das proteínas miofibrilares, contribuindo com a formação da textura dos salames, potencializa o sabor e influi no desenvolvimento do aroma (ORDÓÑEZ et al., 2005; RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005).

O consumo excessivo de sal tem sido relacionado com a hipertensão, aumentando o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005). A relação entre o consumo de alimentos e a saúde vem cada vez

mais sendo observada. Os consumidores têm demonstrado interesse pela composição dos alimentos e o impacto sobre a saúde, levando as indústrias e centros de pesquisas ao desenvolvimento de alimentos com propriedades saudáveis. Porém, o sal desempenha funções tecnológicas o que limita a sua redução no desenvolvimento de novos produtos cárneos (IBAÑEZ et al., 1996).

A adição de sacarose em pequenas quantidades contribui com a formação do aroma, bem como juntamente com a glicose serve como fonte de energia para o desenvolvimento de microrganismos desejáveis durante o processamento dos salames (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A metabolização dos açúcares pelos lactobacilos leva a produção de ácidos durante o processamento dos salames, provocando uma redução no pH da massa cárnea (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). O meio ácido da massa cárnea inibe o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e permite a ocorrência de reações responsáveis pela formação da cor característica dos salames. Contudo, a adição exagerada de açúcares leva o desenvolvimento de sabor excessivamente ácidos nos salames (TERRA, 1998).

A adição de nitratos e nitritos de sódio ou de potássio em produtos cárneos tem várias finalidades com destaque para a estabilização da cor, além de contribuir com a formação do aroma, retardar a rancificação e inibir do crescimento de algumas bactérias indesejáveis, principalmente o *Clostridium botulinum* (FRANCO; LANDGRAF, 2006). Para que essas substâncias produzam os efeitos desejados, inicialmente devem sofrer algumas transformações. O nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ) adicionado na massa cárnea é reduzido a nitrito ( $\text{NaNO}_2$ ) pela ação de enzimas nitrato redutases produzidas pelas bactérias, dentre as quais destacam-se as espécies da família *Micrococcaceae* (BUCKENHÜSKES, 1993). Em condições favoráveis, pH entre 5,4 e 6,0, o  $\text{NaNO}_2$  é reduzido a ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) e posteriormente em óxido nítrico (NO). A coloração vermelha característica das carnes curadas é devido à reação do NO com a mioglobina, formando um complexo estável denominado de nitrosomioglobina (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O nitrito atua contra o *C. botulinum* pela inibição do crescimento da célula vegetativa durante o armazenamento, bem como por impedir a germinação de seus esporos. Porém, a quantidade de NO<sub>2</sub> necessária para essa finalidade é maior do que a adicionada para o desenvolvimento da cor e do sabor. Os efeitos antimicrobianos também são devido à ação do ácido nitroso, bem como de produtos de sua reação (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

A utilização de nitrito em salames fermentados pode levar a formação de nitrosaminas, pela reação com aminas biogênicas produzidas pelo processo proteolítico que ocorre durante o processamento dos salames (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2003). Entretanto, a formação das nitrosaminas pode ser reduzida ou evitada pela adição de ácido ascórbico ou sorbato de potássio (BOZKURT; ERKMEN, 2002).

Os ácidos ascórbico e isoascórbico, assim como seus respectivos sais, são normalmente usados como coadjuvantes de cura. Inicialmente, eram usados para melhorar a cor da carne, provavelmente pela capacidade de reduzir a metamioglobina à mioglobina e em potencializar a produção de óxido nítrico. Porém, talvez o mais importante efeito de ascorbatos e isoascorbatos esteja relacionado com sua ação bloqueadora na formação de nitrosaminas em carnes curadas, por reduzir a quantidade de nitrito residual (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Tradicionalmente, na elaboração de salames são adicionados diversos condimentos, com o objetivo de conferir sabor e odor peculiares ao produto. Os temperos utilizados diferem de região para região. A utilização de condimentos específicos permite a obtenção de produtos com características particulares. Entre os condimentos utilizados estão a pimenta preta e a branca, pimentão, cebola, alho, noz moscada, cominho, aipo, cravo da Índia, orégano e vinho tinto (LORENZO et al., 2000; BOZKURT; ERKMEN, 2002; AMBROSIADIS et al., 2004). Esses temperos e outros condimentos adicionados aos salames interferem diretamente ou pela regulação de reação autooxidativas no *flavour* e odor (FLORES et al., 2004).

Além de contribuir com a formação de algumas características sensoriais dos salames, os condimentos também podem interferir no desenvolvimento dos

microrganismos. Alguns óleos essenciais presentes em condimentos impedem o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Por outro lado, outros condimentos, como o cravo da Índia e a noz moscada, podem favorecer o desenvolvimento das bactérias lácticas nos salames, aumentando a concentração de ácidos orgânicos no produto final, e conseqüentemente reduzindo a presença de alguns patógenos como a *Listeria monocytogenes* (SCHEIDT et al., 2003).

GAIO et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum*) *in vitro* e o seu efeito sobre o desenvolvimento de *E. coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) na elaboração de salames. Os autores não observaram atividade antimicrobiana quando da adição da concentração mínima inibitória do óleo essencial na elaboração de salames.

#### 2.2.2 Padrões de Identidade e Qualidade para Salames

A Instrução Normativa Nº 22 de 31 de julho de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), alterada pela Instrução Normativa Nº 55 de 07/07/2003, fixa a identidade e estabelece as características mínimas de qualidade para os diferentes tipos de salames elaborados no Brasil. O Anexo V dessa Instrução Normativa traz o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame, onde o salame é definido como um produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou suína e bovina, adicionado de toucinho, ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado (BRASIL, 2000).

##### 2.2.2.1 Padrões físico-químicos para salames

As características físicas e químicas dos salames além de fornecer informações nutricionais também são utilizadas como um dos parâmetros para avaliar a qualidade do produto. Na Tabela 1 estão descritos os requisitos máximos e mínimos, em relação às características físico-químicas, estipuladas pelo Regulamento Técnico de Identidade

e Qualidade, que os produtos denominados de “Salame” e “Salame Tipo Italiano” devem atender (BRASIL, 2000; BRASIL, 2003).

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS ESTABELECIDAS PARA OS PRODUTOS DENOMINADOS DE “SALAME” E “SALAME TIPO ITALIANO”

PARÂMETROS		SALAME	SALAME TIPO ITALIANO
Aw	Máx.	0,92	0,90
Umidade	Máx.	40%	35%
Gordura	Máx.	35%	32%
Proteína	Mín.	20%	25%
Carboidratos totais*	Máx.	4,0%	4,0%

FONTE: BRASIL, 2000 e \*BRASIL, 2003

#### 2.2.2.2 Padrões microbiológicos para salames

Os microrganismos possuem um papel central quando se trata de alimentos. Algumas espécies podem ser utilizadas como promotoras de um processo tecnológico, sendo responsável pela produção de diversos tipos de alimentos, como leites fermentados, queijos, pães e salames. Também podem causar a deterioração dos alimentos, alterando as características do produto, devido as suas atividades metabólicas durante o crescimento. Algumas espécies de microrganismos ou suas toxinas quando presentes nos alimentos podem causar danos à saúde do homem (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Visando preservar a saúde dos consumidores, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio do Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, estabelece limites para a presença de alguns grupos ou espécies de microrganismos, nas diferentes categorias de alimentos. Na Tabela 2 estão mencionados os padrões microbiológicos que os diferentes tipos de salames devem atender, para que o produto seja próprio para o consumo humano (BRASIL, 2001).

O controle dos microrganismos deteriorantes e patogênicos depende de cuidados em toda a cadeia produtiva, desde a produção da matéria-prima, durante o processamento, incluindo temperatura adequada, equipamentos e utensílios



higienizados, assim como condições higiênico-sanitárias dos manipuladores e no armazenamento do produto acabado (SIQUEIRA Jr et al., 2004).

TABELA 2 – PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA SALAMES

MICROORGANISMOS	TOLERÂNCIA PARA AMOSTRA INDICATIVA
Coliformes a 45°C	$10^3$ NMP.g <sup>-1</sup>
Estafilococos coagulase positiva	$5 \times 10^3$ UFC.g <sup>-1</sup>
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência em 25 g

FONTE: BRASIL, 2001.

Em salames, a produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas, causando a queda do pH, desempenha um papel importante no controle do desenvolvimento microbiano e na produção de toxinas. Entretanto, o processo fermentativo isolado nem sempre impede o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Tem sido destacada a importância de carnes fermentadas como fonte de microrganismos patogênicos, resultando em toxinfecções de origem alimentar. Dentre os patógenos encontrados em salames fermentados destacam-se a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus* (BARBUTI; PAROLARI, 2002; MOORE, 2004).

O grupo denominado de coliformes totais é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, onde os gêneros predominantes são o *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Dentre eles, apenas a *E. coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais, sendo assim indicador de contaminação fecal. Dentre as bactérias do grupo coliformes totais está o grupo dos coliformes fecais, que apresentam a capacidade de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubadas a 44-45,5°C. Nessas condições de análise, em torno de 90% das culturas de *E. coli* são positivas, enquanto que somente algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm essa característica (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Esses microrganismos também são denominados de “coliformes a 45°C” ou “coliformes termotolerantes” (BRASIL, 2001).

Além de ser um indicador da contaminação fecal recente, a presença de *E. coli* em alimentos também representa riscos à saúde dos consumidores, pois algumas cepas

são comprovadamente patogênicas, podendo causar sérios danos à saúde do homem e de animais (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Na literatura são relatados vários casos da presença de *E. coli* O157:H7 em salames fermentados (INCZE, 1998; PEREIRA, 2004; SIRIKEN et al., 2006).

Outra enterobactéria capaz de provocar infecção de origem alimentar é a *Salmonella*. Seu principal reservatório é o trato gastrointestinal do homem e animais, principalmente aves e suínos. Esses microrganismos apresentam multiplicação ótima em pH próximo da neutralidade, porém valores de pH (4,0 e 9,0) extremos têm ação bactericida. São microrganismos mesófilos e se desenvolvem em temperaturas entre 5 e 47°C. Toleram concentrações de NaCl superior à utilizada nas formulações de salames, todavia são sensíveis ao nitrito (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A maioria dos alimentos contaminados por *Salmonella* são as carnes, em particular salames e hambúrgueres. A emergência de estirpes resistentes a vários antibióticos faz com que doenças causadas por esses microrganismos sejam mais perigosas. Mesmo em países desenvolvidos, como os da Europa, foi isolada *Salmonella* em salames fermentados, como também, da superfície de equipamentos de unidades produtoras de salames (SIRIKEN et al., 2006; TALON et al., 2007).

O gênero *Staphylococcus* é constituído por 32 espécies, destas as seguintes são importantes para a saúde pública o *S. aureus*, o *S. hyicus*, o *S. chromogenes* e o *S. intermedius*, sendo que o *S. aureus* é o principal responsável por causar intoxicação alimentar. Exceto a espécie *S. chromogenes*, as demais são capazes de produzir coagulase e foram descritas como produtoras de enterotoxinas, sendo associadas a surtos de intoxicações alimentares em humanos (SILVA; GANDRA, 2004).

Os *Staphylococcus aureus* são capazes de se desenvolver em condições bastante variáveis. São mesófilos, com crescimento na faixa entre 7 e 47°C, sendo que as enterotoxinas são produzidas em temperaturas de 10 a 46°C. Toleram altas concentrações de NaCl (10%-20%) e também são resistentes aos nitratos. O *S. aureus* se multiplica em pH de 4,0 a 9,8, tendo desenvolvimento ótimo em valores próximos da neutralidade, como para a grande maioria das bactérias. Em relação a Aw, esses microrganismos se desenvolvem em valores considerados baixos (0,83) para bactérias

não halófilas. Assim, os produtos cárneos curados podem ser veículos potenciais para esses microrganismos (FRANCO; LANDGRAF, 1996; SILVA; GANDRA, 2004).

A *Listeria monocytogenes* tornou-se um dos mais importantes patógenos vinculados por alimentos, a partir da década de 80, devido à ocorrência de diversos surtos de listeriose humana (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Sendo especialmente perigosa para crianças, idosos, imunocomprometidos e para gestantes, podendo causar aborto (TYÖPPÖNEN et al., 2003). Esse microrganismo encontra-se amplamente disseminado na natureza, tendo sido isolado de diversos tipos de alimentos, como leites crus e pasteurizados, queijos, carnes, embutidos, produtos cárneos termoprocessados e peixes (GANDDHI; CHIKINDAS, 2007).

A *L. monocytogenes* tem a capacidade de se multiplicar ou de resistir a condições consideradas adversas para outros patógenos, desenvolvendo-se numa ampla faixa de pH (4,5 a 9,5), em concentrações de NaCl acima da utilizada para a grande maioria dos alimentos, suporta repetidos congelamentos e descongelamentos, e se multiplicar em  $A_w$  de 0,92 considerada baixa para patógenos. Também é uma das células vegetativas de maior resistência térmica (FRANCO; LANDGRAF, 1996; MATARAGAS; DROSINOS; METAXOPOULOS, 2003; GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

Uma solução nova para diminuir o risco de listeriose é a seleção de culturas bioprotetoras para a utilização no processamento de alimentos. As bactérias lácticas produzem ácidos orgânicos a partir de açúcares durante a etapa de fermentação, sendo que algumas espécies também são capazes de produzir compostos antimicrobianos (bacteriocinas) com atividade frente diferentes espécies de bactéria. Um dos fatores que se deve levar em conta durante a seleção de cepas, para a utilização como culturas *starter*, é a capacidade dos microrganismos em produzir compostos antimicrobianos frente a patógenos de importância em alimentos (NIETO-LOZANO et al., 2002; O'SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002; TYÖPPÖNEN et al., 2003; NIETO-LOZANO et al., 2006).

### 2.2.3 Critérios de Seleção de Bactérias Lácticas para Uso como Culturas *Starter* em Salames

Cultura *starter* pode ser definida como uma preparação ou material contendo um grande número de microrganismos para se adicionar na matéria-prima com o objetivo de acelerar o processo de fermentação. Adaptados ao substrato, os *starter* dominam o processo fermentativo e permitem a obtenção de produtos com características esperadas e constantes (HOLZAPFEL, 2002; LEROY; De VUYST, 2004).

Durante a seleção de culturas *starter* para aplicação em alimentos, vários critérios específicos devem ser considerados, dentre os quais estão as características da matéria-prima, a tecnologia a ser aplicada para a produção, a atividade metabólica e as características desejadas no produto final (BUCKENHÜSKES, 1993).

Além de características fisiológicas adequadas, as culturas *starter* devem apresentar propriedades metabólicas específicas, que permitam a transformação da matéria-prima em um produto final. Dessa forma, as características fisiológicas e bioquímicas dos microrganismos, além de serem utilizadas para caracterizar as espécies, também são usadas como ferramenta para selecionar e classificar grupos de microrganismos com potencial para uso industrial (HAMMES; BANTLEON; MIN, 1990).

As bactérias lácticas ocupam importante papel na produção de alimentos fermentados. Estão envolvidas na elaboração de vários alimentos, tais como leites fermentados, queijos, vegetais fermentados e salames. Esses microrganismos causam a rápida acidificação da matéria-prima pela produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico e também produzem ácido acético, etanol, compostos aromáticos, bacteriocinas, exopolissacarídeos e várias enzimas. Dessa forma, aumentam a vida-de-prateleira e a segurança microbiológica, melhoram a textura e contribuem com o agradável perfil sensorial do produto final (LEROY; De VUYST, 2004).

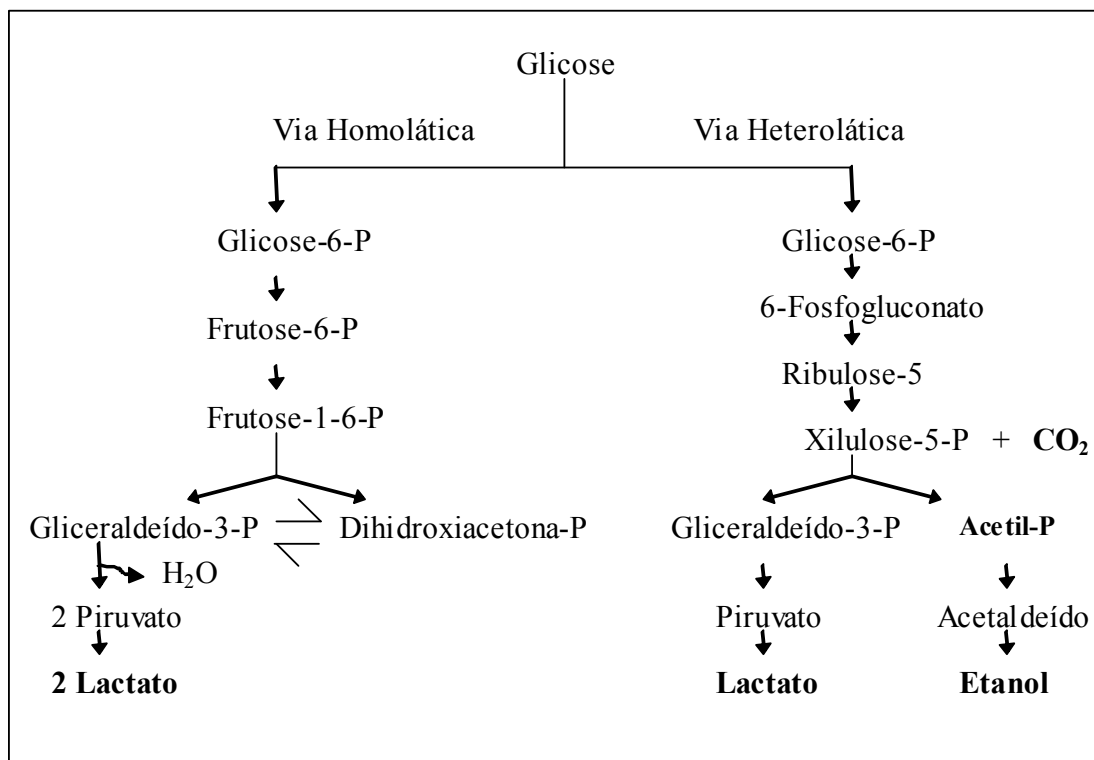
Dentro do grupo das bactérias lácticas existe uma grande variação em relação aos aspectos morfológicos e fisiológicos, porém também apresentam algumas características comuns: são cocos ou bacilos; Gram positivos; imóveis; não esporulados, catalase e oxidase negativa, não degradam a gelatina e não produzem sulfeto de hidrogênio (ROISSART; LUQUET, 1994; WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

As bactérias lácticas são geralmente mesófilas, entretanto conseguem crescer em uma faixa de temperatura bastante ampla, desde inferiores a 5°C ou superiores a 45°C. Da mesma forma, a maioria das cepas são metabolicamente ativas em uma ampla faixa de pH, sendo observado atividade para algumas cepas em pH extremo de 9,6 e para outras em pH de 3,2 (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). A capacidade de crescimento em diferentes temperaturas e valores de pH, juntamente com a tolerância ao oxigênio e a diferentes concentrações de NaCl e nitrito, são características fisiológicas importantes que as culturas *starter* devem apresentar, para que seu uso não seja limitado pelas condições do processamento.

#### 2.2.3.1 Capacidade de acidificação

Tradicionalmente, as bactérias lácticas são definidas pela capacidade de produzirem ácido láctico como único ou principal produto final do metabolismo dos carboidratos. Em relação ao catabolismo dos carboidratos, as bactérias lácticas podem ser classificadas como homolácticas ou heterolácticas. As espécies classificadas como homolácticas metabolizam as hexoses pela via de Embden-Meyerhof-Parnas gerando dois moles de lactato por mol de glicose. Dentre as bactérias lácticas homofermentadoras estão os gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e algumas espécies de *Lactobacillus*. As bactérias heterolácticas utilizam a via das hexoses monofosfato ou via das pentoses, produzindo quantidades equimolares de lactato, gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e etanol. O gênero *Leuconostoc* e algumas espécies de *Lactobacillus* são tipicamente heterofermentadores (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). Um esquema geral da fermentação da glicose pelas bactérias lácticas está apresentado na Figura 1.

FIGURA 1 – ESQUEMA GERAL DO CATABOLISMO DA GLICOSE PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS

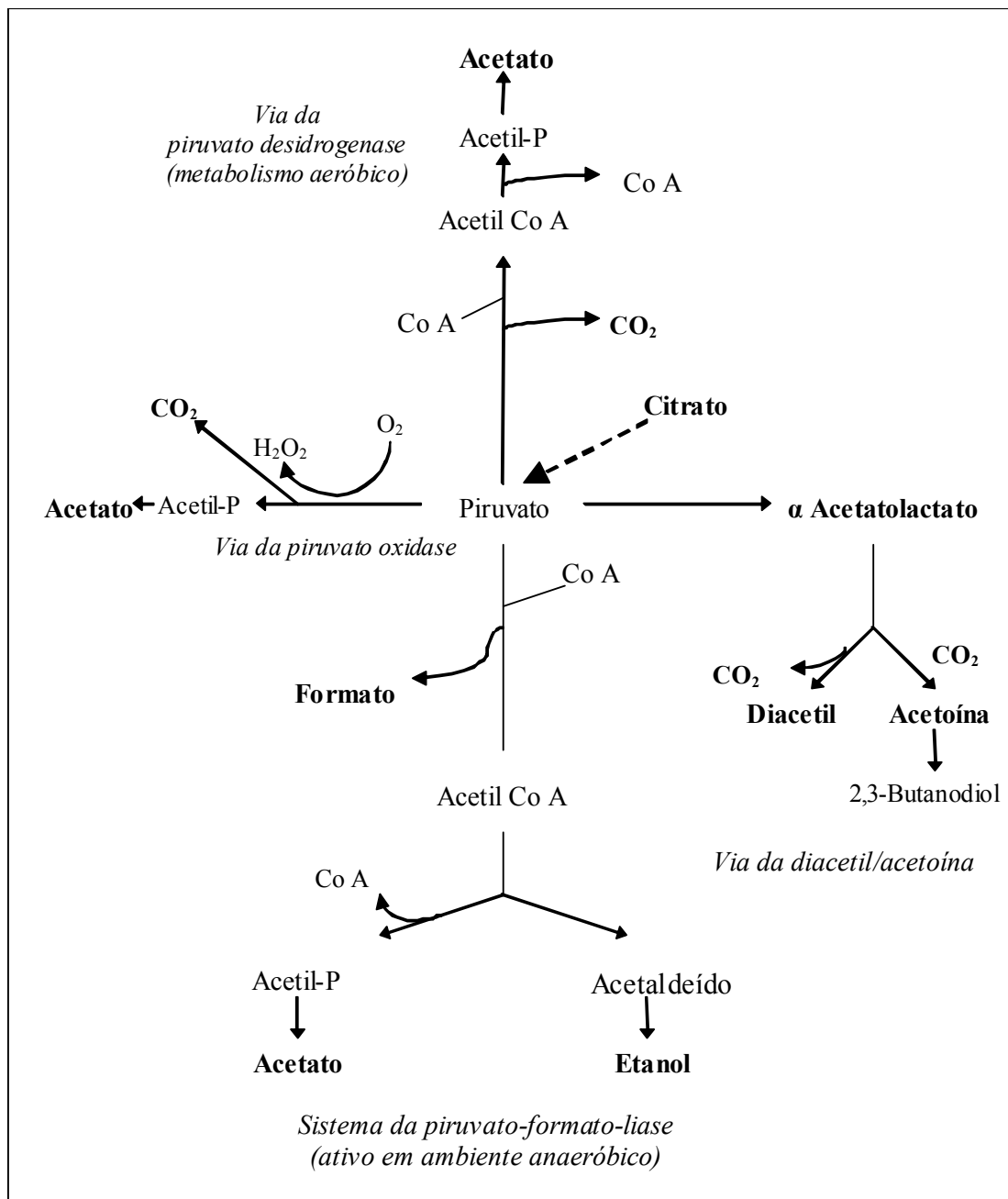


FONTE: CAPLICE; FITZGERALD, 1999.

O ácido láctico produzido pelas bactérias lácticas durante a fermentação pode ser de isômeros diferentes, geralmente é produzido L (+), menos freqüentemente o D (-) ou ainda uma mistura racêmica de ambos. Cabe ressaltar que o D (-) ácido láctico não é metabolizado pelo homem, podendo causar acidose. Dessa forma, não é recomendado para crianças e jovens, sendo que a ingestão diária máxima indicada é de 100 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; HOLZAPFEL, 2002).

Outros compostos importantes como o diacetil, a acetoína, o acetato, CO<sub>2</sub> e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) são formados pelo catabolismo do piruvato pelas bactérias lácticas. Um esquema geral com as diferentes vias de degradação do piruvato pelas bactérias lácticas está apresentado na Figura 2.

FIGURA 2 – ESQUEMA GERAL DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS METABÓLICOS IMPORTANTES A PARTIR DO PIRUVATO PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS



FONTE: CAPLICE; FITZGERALD, 1999.

A produção de ácidos orgânicos pelas bactérias lácticas, na etapa de fermentação, durante o processamento de salames, provoca a queda do pH da massa cárnea. A redução do pH ocasiona os seguintes efeitos nos salames: a) coagulação das

proteínas que contribui com a formação da textura e da fatiabilidade, b) formação do gosto ácido característico, c) aumento da estabilidade dos salames e da segurança alimentar e d) desenvolvimento da cor vermelha característica dos produtos curados (HAMES; BANTLEON; MIN, 1990; BUCKENHÜSKES, 1993; SANTOS; et al., 1998). Para garantir a ocorrência desses efeitos a taxa de crescimento das bactérias e a capacidade de formação de ácido, nas condições de fermentação utilizadas durante o processamento dos salames, são critérios importantes durante a seleção de cepas de bactérias lácticas para a utilização como culturas *starter* (BUCKENHÜSKES, 1993).

Embora a taxa de crescimento bacteriano e a quantidade de ácido formado poderem ser influenciados pela temperatura, bem como pela quantidade e tipo de açúcar adicionado, existe a necessidade da seleção de espécies com diferentes padrões de crescimento e acidificação. Essa demanda está relacionada às diferentes condições e com a tecnologia utilizada na elaboração dos vários tipos de salames. Nos Estados Unidos, a fermentação do “salame de verão” (“*Summer sausage*”) é realizada em temperaturas elevadas, acima de 40°C, sendo que os salames ficam prontos em 48 h. Por outro lado, na Hungria, os salames são tradicionalmente fermentados em temperaturas abaixo de 10°C até que a  $A_w$  atinja valores entre 0,93 e 0,92 (BUCKENHÜSKES, 1993).

A rápida formação de ácido no início da fermentação é uma condição essencial na fabricação de salames, entretanto a acidificação excessiva, freqüentemente está relacionada com defeitos de coloração e às vezes com a formação de gás, sendo um dos mais importantes problemas dos salames fermentados (BUCKENHÜSKES, 1993).

#### 2.2.3.2 Produção de dióxido de carbono

As bactérias heterofermentativas podem produzir grande quantidade de dióxido de carbono, isso leva a formação de orifícios de diferentes tamanhos nos salames. Sendo assim, tem sido proposto que a taxa de formação de  $\text{CO}_2$  a partir de



glicose é um importante critério de seleção de culturas *starter* para a elaboração de salames (BUCKENHÜSKES, 1993).

#### 2.2.3.3 Produção de peróxido de hidrogênio

A grande maioria dos *Lactobacillus* é capaz de produzir peróxido de hidrogênio pela oxidação do lactato. Em certos alimentos isso é positivo, pois resulta na inibição de microrganismos indesejáveis. Entretanto, em produtos cárneos, os peróxidos levam a descoloração visto que essas substâncias atacam os heme-pigmentos. Em salames produzidos por fermentação espontânea tem sido verificada a predominância de *L. sakei* e *L. curvatus*, sendo que várias cepas dessas espécies produzem rapidamente  $H_2O_2$ . Culturas *starter* para a elaboração de salames devem apresentar pouca ou nenhuma capacidade de formação de peróxido de hidrogênio (BUCKENHÜSKES, 1993).

#### 2.2.3.4 Produção de dextrana

A produção de dextrana a partir de sacarose é verificada em várias espécies de bactérias lácticas. Quantidades de até  $7 \log \text{UFC.g}^{-1}$  de *L. sakei* produtores de dextrana, em salames fermentados, não causam efeitos negativos durante a maturação ou na cor e na consistência do produto. Porém, microrganismos produtores de cápsula podem se tornar um problema para a indústria de alimentos, pois se aderem na superfície de equipamentos e podem provocar a contaminação cruzada de outros produtos. Dessa forma, é benéfico o uso de culturas *starter* não produtoras de dextrana (BUCKENHÜSKES, 1993).

#### 2.2.3.5 Atividade bioprotetora

Uma grande quantidade e variedade de microrganismos são encontradas nos alimentos, sejam industrializados ou não. Esses microrganismos podem provocar

alterações nas características sensoriais, diminuindo a vida-de-prateleira do produto, ou podem causar danos à saúde do consumidor pela ingestão de microrganismos patogênicos ou suas toxinas. Dentre os diversos métodos de preservação dos alimentos, a indústria utiliza conservantes químicos para evitar o desenvolvimento microbiano. Porém, a cada dia aumenta a procura por alimentos que não sejam adicionados de produtos químicos (LÜCKE, 2000; MARTINS; ALVES; FRANCO, 2003; LEROY; De VUYST, 2004; AMMOR et al., 2006).

Uma das possibilidades para substituir parcialmente ou totalmente os conservantes químicos é a utilização de certos microrganismos, denominados de culturas bioprotetoras ou seus metabólitos, que são capazes de impedir ou retardar o desenvolvimento de espécies patogênicas e deteriorantes. As culturas bioprotetoras podem atuar como culturas *starter* na elaboração de alimentos fermentados ou somente proteger aos alimentos sem provocar alterações sensoriais (TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTLA-SANDHOLM, 2003; MILANI et al., 2003).

Os mecanismos antimicrobianos específicos das bactérias lácticas, explorados na bioconservação de alimentos, incluem a produção de ácidos orgânicos, etanol, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, acetaldeído, diacetil, compostos antimicrobianos de largo espectro como a reuterina e a produção de bacteriocinas (CAPLICE; FITAGERALD, 1999; HANSEN, 2002).

O efeito antimicrobiano direto dos ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico) produzidos pelas bactérias lácticas, durante a fermentação dos alimentos, está relacionado com a ação desses ácidos, sobre a membrana citoplasmática dos microrganismos. A atividade antimicrobiana de cada ácido a uma dada concentração molar não é igual, sendo que o ácido acético é mais inibidor que o lático. Entretanto, somente baixa quantidade de ácido acético é aceito em salames do ponto de vista sensorial (CAPLICE; FITAGERALD, 1999; LÜCKE, 2000). Os ácidos interferem na manutenção do potencial da membrana resultando na inibição do transporte ativo e na alteração da permeabilidade seletiva da membrana. A quantidade e o tipo de ácidos produzidos durante a fermentação dependem da espécie ou da cepa da bactéria láctica, da composição da cultura e das condições de crescimento (AMMOR et al., 2006).

A contribuição do acetaldeído na biopreservação é pequena, visto que o limiar mínimo percebido no *flavour* é muito menor do que o considerado necessário para provocar a inibição de microrganismos. Da mesma forma, a quantidade de etanol produzida pelas bactérias lácticas em alimentos fermentados é muito baixa, sendo assim a sua contribuição é mínima na inibição microbiana (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

O diacetil é produzido por cepas de todos os gêneros de bactérias lácticas pela fermentação do citrato e interfere nas propriedades sensoriais. Esse composto inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas de forma mais eficiente do que as Gram-positivas, por interferir na utilização da arginina. Concentrações de  $344 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de diacetil inibem cepas de *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* e *Aeromonas* (TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2002; AMMOR et al., 2006). Porém, em salames, o diacetil não é produzido em quantidade suficiente para melhorar a segurança e a estabilidade do produto (LÜCKE, 2000).

O peróxido de hidrogênio e o dióxido de carbono são duas substâncias que podem ser produzidas durante a fermentação láctica. Em alguns tipos de alimentos fermentados, o  $\text{CO}_2$  contribui na formação das características do produto (HANSEN, 2002). O  $\text{CO}_2$  juntamente com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  também pode exercer efeito antimicrobiano frente a microrganismos indesejáveis (AMMOR et al., 2006). Entretanto, tanto a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como a de  $\text{CO}_2$  não são características desejáveis em culturas *starter* para a produção de salames, pois podem provocar alterações na textura e na coloração desses produtos (BUCKENHÜSKES, 1993).

Os efeitos de preservação obtidos em muitos produtos fermentados é devido ao acúmulo de ácidos orgânicos concomitantemente com a redução da quantidade de açúcares livres, com o esgotamento do oxigênio e pelo baixo pH. Entretanto, culturas que apresentam uma capacidade maior de preservação têm sido identificadas e, em muitos casos, são produtoras de bacteriocinas antimicrobianas (HANSEN, 2002).

As bacteriocinas têm despertado um grande interesse na indústria de alimentos pelo seu potencial de aplicação na preservação de alimentos. As bacteriocinas são substâncias antimicrobianas de natureza protéica que possuem efeito bactericida ou

bacteriostático frente a alguns microrganismos. As cepas produtoras de bacteriocinas são imunes a essas substâncias (AMMOR et al., 2006). Enzimas proteolíticas presentes no substrato são capazes de inativar as bacteriocinas (HOLZAPFLEL, 2002), bem como, devido à sua natureza protéica, as bacteriocinas são rapidamente degradadas durante a digestão humana, em nutrientes comuns, não representando nenhum risco à saúde (TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTLA-SANDHOLM, 2003).

Várias bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas são capazes de inibir a *Listeria*, mas somente poucas são efetivas contra *Bacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus*. Em geral, as bacteriocinas exercem seus efeitos inibitórios pela formação de poros na membrana celular das células sensíveis, alterando a permeabilidade. As bactérias Gram-positivas diferem na sensibilidade provavelmente pelas diferenças na composição e na fluidez da membrana (LÜCKE, 2000). O alvo das bacteriocinas é a membrana citoplasmática e devido a presença da membrana externa, as bactérias Gram-negativas estão geralmente protegidas. No entanto, a perda da integridade da membrana externa, pelas condições de processamento utilizadas, pode aumentar a ação das bacteriocinas frente a bactérias Gram-negativas (CAPLICE; FITAGERALD, 1999).

A nisina produzida por *Lactococcus lactis* foi a primeira bacteriocina descoberta e está em uso há mais de cinquenta anos como conservante de alimentos, sendo liberada na maioria dos países (REUNANEN; SARIS, 2004). Existe um grande número de bacteriocinas identificadas, produzidas por várias espécies de bactérias lácticas, como *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* (DICKS; MELLETT; HOFFMANN, 2004). Porém, devido à grande dificuldade da introdução de novas bacteriocinas em alimentos, a biopreservação está sendo focada na utilização de microrganismos que podem ser aplicados em vez de bacteriocinas purificadas (HANSEN, 2002; O'SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002).

#### 2.2.3.6 Atividade probiótica

Os consumidores estão cada vez mais atentos à relação consumo de alimentos e saúde. Como consequência, o mercado de alimentos que além de nutrir possuem propriedades que promovem a saúde, denominados de alimentos funcionais, tiveram um extraordinário crescimento nos últimos anos (LEROY; De VUYST, 2004). Dessa forma, as características probióticas dos microrganismos devem ser levadas em conta durante a seleção de culturas *starter* para a elaboração de alimentos fermentados (HOLZAPFEL, 2002). A utilização de culturas *starter* funcionais, denominadas de probióticas, podem contribuir com a segurança alimentar, com a formação das características sensoriais, com o aumento do valor nutritivo e ainda proporcionar benefícios à saúde (LEROY; De VUYST, 2004).

A presença da flora microbiana é necessária para o bom funcionamento do sistema digestivo. O desequilíbrio da flora microbiana intestinal leva a perturbações intestinais, como diarreias ou constipação, sendo assim, a saúde depende da manutenção da flora bacteriana (HANSEN, 2002). Para que as bactérias probióticas exerçam efeitos benéficos no intestino grosso acredita-se que é necessária a ingestão diária de  $10^8$  células ou mais. Por isso, para que os alimentos sejam considerados probióticos acredita-se que devem conter no mínimo  $10^6$  bactérias.g<sup>-1</sup> (LÜCKE, 2000).

A habilidade em produzir diferentes compostos antimicrobianos, como bacteriocinas e/ou compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, talvez seja uma das principais características para causar a exclusão por competição de patógenos e sobreviver no intestino para expressar os efeitos probióticos ao hospedeiro. Além disso, os efeitos probióticos talvez estejam relacionados com a produção de ácido láctico que combinados com os sais biliares inibem o crescimento de bactérias patogênicas Gram-negativas (TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2003).

Diferentes características são usualmente investigadas *in vitro* durante a seleção de microrganismos para verificar seu potencial probiótico. A resistência à acidez e a tolerância aos sais biliares são duas propriedades fundamentais para os

microrganismos probióticos sobreviverem às condições ácidas do estômago e aos sais biliares no intestino delgado durante a passagem pelo trato gastrintestinal (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000). Também a capacidade de adesão nas células do epitélio intestinal e a capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos são características importantes para cepas com potencial probiótico (PENNACCHIA; VAUGHAN; VILLANI, 2006).

Salames fermentados probióticos elaborados com a adição de bifidobacterias foram comercializados por algum tempo na Alemanha, porém a viabilidade da cepa utilizada era baixa durante o processamento dos salames, necessitando a inoculação de alta quantidade para manter concentração acima de  $10^6$  células.g<sup>-1</sup> após a fermentação. Os lactobacilos são candidatos melhores para o uso como culturas probióticas em carnes, por suportarem melhor as condições de fermentação e a passagem pelo estômago e intestino delgado durante a digestão (LÜCKE, 2000).

## 2.3 ANTIOXIDANTES NATURAIS

A oxidação lipídica é um dos principais processos pelo qual a qualidade nutricional e sensorial de alimentos gordurosos diminui, pois ela causa a degradação de ácidos graxos polinsaturados e a geração de produtos residuais, com formação de aldeídos, cetonas e outros produtos derivados dos lipídeos. Parte da qualidade nutricional e sensorial dos produtos cárneos está relacionada com a presença dos lipídeos e de sua composição. Para proteger os lipídeos e evitar sua deterioração sensorial aparente é necessária a utilização de aditivos com propriedades antioxidantes (TRINDADE, 2007).

Os antioxidantes são substâncias capazes de seqüestrar ou impedir a formação de radicais livres. O mecanismo de ação dos antioxidantes está bem elucidado, isto é, para que um composto seja eficiente na redução das reações de autooxidação é necessário que ele iniba a formação de radicais livres na iniciação da cadeia de oxidação ou interrompa sua propagação (TRINDADE, 2007).

BOZKURT (2006) relata que as ervas e temperos são geralmente usados em alimentos para melhorar atributos como o *flavour* ou a cor. Entretanto, estes produtos

também podem apresentar ação antimicrobiana e antioxidante. Os antioxidantes comumente utilizados na indústria de alimentos são o butil-hidroxianisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT) e o t-butilhidroquinona (TBHQ). Porém, estes antioxidantes sintéticos estão sendo proibidos em muitos países devido ao potencial carcinogênico. Recentemente, os antioxidantes naturais estão fazendo parte da dieta humana, com o objetivo de diminuir os riscos de doenças cardíacas, de câncer e também de diabetes. Além disso, é relatado que os antioxidantes de origem natural são mais potentes que os sintéticos, especialmente o alecrim, a sálvia e os extratos de chá verde.

As propriedades antioxidantes naturais encontradas em algumas frutas, ervas e condimentos estão relacionados com a presença de compostos fenólicos (LEJA et al., 2007). Todavia, a concentração destes compostos pode variar muito devido a influências do solo, clima e variedades cultivadas (BOZKURT, 2006).

MACEDO (2005) cita que vários estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de extratos naturais com ação antioxidante, para o uso em produtos cárneos. Dentre os quais, o uso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), marcela do campo (*Achryrocline satureioides*) e casca de batata (*Solanum tuberosum*) que possuem flavonóides e ácidos fenólicos em sua composição. A utilização de extratos é vantajosa, pois não apresentam contaminantes microbiológicos, são desodorizados e não são visíveis no produto, permitindo a obtenção de produtos padronizados.

O extrato de marcela do campo (*Achryrocline satureioides*) foi utilizado na elaboração de salames para verificar seu potencial antioxidante durante o processamento e o armazenamento do produto. A ação do extrato hidroetanólico na redução da oxidação dos lipídeos foi verificada somente quando associada à inoculação de *Lactobacillus paracasei* (MACEDO, 2005).

Produtos naturais e a preparação de alimentos como suplementos nutricionais ou para propósitos dietéticos têm recebido maior atenção recentemente. Os derivados da exploração apícola como o pólen são utilizados há muito tempo pela medicina tradicional, bem como em alimentos para fins específicos pelas suas propriedades nutricionais e fisiológicas. O pólen apícola é proveniente de diversas espécies de

plantas e pode ser considerado fonte de energia e de nutrientes para o consumo humano. Contém substâncias nutricionais essenciais, tais como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, vitaminas, minerais e elementos traços. Também são encontradas quantidades significativas de compostos fenólicos, principalmente flavonóides (KROYER; HEGEDUS, 2001; CARPES et al., 2007).

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos em alimentos de origem vegetal e são considerados antioxidantes efetivos. Entre os compostos fenólicos naturais com atividade antioxidante destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos e o tocoferol. Dentre os flavonóides estão as antocianidinas, flavonóis, flavonas, flavononas e isoflavonas (BONVEHI, TORRENTÓ, LORENTE, 2001).



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRAS DE SALAMES**

Para determinar as características físico-químicas e microbiológicas, bem como para isolar cepas de bactérias lácticas de salames produzidos sem a adição de culturas iniciadoras (salame artesanal), fabricados por pequenas indústrias do setor de carnes do Sul do Brasil, foram coletadas cinquenta amostras dos mencionados salames, em supermercados e feiras-livres. Pela data de fabricação verificou-se que as amostras apresentavam diferentes tempos de processamento e/ou armazenamento.

#### **3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

Para a realização das análises físico-químicas, as amostras foram homogeneizadas em um multiprocessador (Arno) e logo a seguir retiradas as alíquotas necessárias para cada determinação. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

##### **3.2.1 Determinação do pH**

Os valores de pH dos salames foram medidos em potenciômetro digital (Requipal RQ210). Dez gramas da amostra foram homogeneizadas em 90 ml de água destilada por dois minutos e a leitura feita após cinco minutos de estabilização (SAMELIS et al., 1994).

##### **3.2.2 Determinação da Atividade de Água ( $A_w$ )**

A  $A_w$  das amostras foi medida utilizando o equipamento Aqualab, modelo CX2, Decagon Devices Inc. (AMBROSIADIS et al., 2004).

### 3.2.3 Determinação de Umidade

O conteúdo de umidade das amostras dos salames foi calculado após desidratação em estufa a  $102 \pm 3^{\circ}\text{C}$  até peso constante (SAMELIS et al., 1994).

### 3.2.4 Determinação de Cinzas

O teor de cinzas das amostras de salames foi quantificado de acordo com os procedimentos, baseados na destruição da matéria orgânica por aquecimento a  $500^{\circ}\text{C}$  (AOAC, 2000).

### 3.2.5 Determinação de Proteínas

O teor de proteínas das amostras foi determinado pelo método de Kjeldhal, através da determinação do nitrogênio total (AOAC, 2000).

### 3.2.6 Determinação de Lipídios

A determinação do teor de lipídeos das amostras foi feita pelo método de BLIGH & DYER (1959) por extração com metanol-clorofórmio (SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005).

## 3.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para as determinações microbiológicas, o envoltório do salame foi removido assepticamente. De cada amostra foi coletado 25 gramas adicionados em 225 ml de solução diluente (água peptonada estéril 0,1%) e homogeneizadas por 60 segundos (SAMELIS et al., 1994). As diluições decimais necessárias foram feitas no mesmo diluente, e alíquotas das diluições apropriadas foram semeadas em duplicata em meios de cultura seletivos e não seletivos, para a determinação da microbiota presente.

### 3.3.1 Contagem Total de Bactérias Mesófilas Aeróbias e/ou Facultativas

A contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e/ou facultativas foi feita em placas com Ágar Padrão para Contagem (PCA), depois de incubadas em estufa por 48 h a 35°C (SAMELIS et al., 1994).

### 3.3.2 Contagem de Bolores e Leveduras

A contagem de bolores e leveduras presentes nas amostras de salames foi feita em placas com Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), depois de incubadas em estufa por 5 dias a 25°C (SAMELIS et al., 1998).

### 3.3.3 Contagem de Bactérias Lácticas

A quantidade de bactérias ácido-lácticas das amostras de salames foi determinada pela técnica de semeadura em profundidade (pour plate), com a adição de sobrecamada, em placas com Ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS) adicionado de azul de anilina, depois de incubadas em estufa por 48 h a 35°C (SAMELIS et al., 1998).

O meio MRS com azul de anilina permite um melhor reconhecimento das cepas de bactérias lácticas, isto se deve ao fato de que as bactérias lácticas têm a propriedade de assimilar o azul de anilina do meio, além de facilitar o reconhecimento das características morfológicas das colônias (GIRAUD, 1992). A solução do corante foi preparada dissolvendo 0,1 g de azul de anilina em 2,5 ml de água destilada e esterilizada a 121°C por 15 minutos. O corante foi adicionado (0,3% v/v) após a esterilização e resfriamento do MRSA (45-50 °C).

#### 3.3.4 Contagem de Bactérias da Família *Micrococcaceae*

A quantidade de bactérias da família *Micrococcaceae* nas amostras de salames foi determinada em placas com Ágar Mannitol Salt (MSA), depois de incubadas por 48 h a 35°C (SAMELIS et al., 1998).

#### 3.3.5 Contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva

A quantidade de *Staphylococcus* coagulase positiva das amostras foi determinada em placas com Ágar Baird Parker (BP) suplementado com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio, depois de incubadas por 48 h a 35°C (COMI et al., 2005). As colônias típicas foram submetidas ao teste de coagulase utilizando o sistema Staphclin® (LABORCLIN).

#### 3.3.6 Contagem de Coliformes Totais, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli*.

Para essas determinações foi utilizada a técnica de tubos múltiplos (Número Mais Provável - NMP). Os coliformes totais foram determinados em tubos com caldo Verde Brilhante Bile a 2% (VB), após incubação em estufa por 24-48 horas a 35°C. Os coliformes a 45°C foram determinados em tubos com caldo *Escherichia coli* com 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo (EC - MUG), após incubação em banho-maria por 24 h a 44,5°C. *Escherichia coli* foi determinada utilizando os tubos positivos do teste de coliformes a 45°C, aqueles com cultura fosforescente em câmara escura com lâmpada ultravioleta (365 nm) foram considerados positivos para *E. coli* (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

#### 3.3.7 Determinação da Presença de *Salmonella*

Para determinar a presença de *Salmonella*, o pré-enriquecimento foi feito adicionando 25 gramas da amostra em 225 ml de Caldo Lactosado e incubado por 18–

20 h a 35°C. Da cultura pré-enriquecida foi transferido 1 ml para tubos com 10 ml de Caldo Tetrationato (TT) e Caldo Selenito Cistina (SC), os quais foram incubados por 24 h a 35°C. Após, as culturas foram estriadas em placas com Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), Ágar Bismuto Sulfito (BS) e Ágar Entérico de Hectoen (HE) e incubadas a 35°C por 24 h para verificar o crescimento de colônias típicas de *Salmonella*. As colônias características de *Salmonella* foram inoculadas em tubos com Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Ágar Ferro Lisina (LIA). As colônias isoladas com reação típica de *Salmonella* (SILVA; JUNQUEIRA, SILVEIRA 2007) foram submetidas aos testes bioquímicos do sistema de identificação BACTRAY I® e BACTRAY II® (LABORCLIN).

### 3.3.8 Determinação da Presença de *Listeria monocytogenes*

Para a detecção de *Listeria monocytogenes*, de cada amostra foram coletados 25 gramas e adicionados em caldo Fraser (225 ml). Após incubação por 18-24 horas a 25°C as culturas foram estriadas em placas contendo Ágar *Listeria* Ottavani e Agosti (ALOA) e incubadas em estufa por 24 horas a 37°C (LEBERT et al., 2007). Colônias azuis claras sem halo opaco são típicas de *Listeria* spp. As colônias típicas foram cultivadas em ágar Soja Trypticase suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE), e depois submetidas às provas bioquímicas de acordo com as metodologias descritas por SILVA; JUNQUEIRA, SILVEIRA (2007).

#### 3.3.8.1 Teste de catalase

A verificação da produção da enzima catalase pelas cepas suspeitas foi feita adicionando gotas de peróxido de hidrogênio (3%) sobre as culturas dispostas em uma lâmina de microscopia.

### 3.3.8.2 Teste de motilidade

As culturas suspeitas dos tubos de TSA-YE foram inoculadas em tubos com Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM) e incubadas em estufa por sete dias a 25°C.

### 3.3.8.3 Teste de redução do nitrato

A partir das culturas suspeitas armazenadas nos tubos de TSA-YE foram inoculados tubos contendo caldo nitrato e incubados em estufa por cinco dias a 35°C.

### 3.3.8.4 Reação em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)

Cada cultura suspeita cultivada em TSA-YE foi inoculada por picada e estrias na rampa e incubada a 35°C por 24 horas.

### 3.3.8.5 Teste de verificação de hemólise

As culturas suspeitas foram inoculadas por picada em placas com Ágar Sangue Nº 2 e incubadas a 35°C por 48 horas.

### 3.3.8.6 Teste de fermentação da dextrose, xilose, rhamnose, manitol, maltose e esculina

As culturas suspeitas foram inoculadas em tubos contendo caldo Púrpura Base suplementado com 0,5% de cada carboidrato a ser testado e incubados em estufa a 35°C por sete dias.

### 3.3.8.7 CAMP teste

Foi realizado inoculando por estrias as culturas suspeitas em placas contendo Ágar Sangue Nº 2, juntamente com uma cultura  $\beta$ -hemolítica de *Staphylococcus aureus* e uma cultura de *Rhodococcus equii*. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24-48 horas.

## 3.4 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

Das placas com ágar MRS adicionado de azul de anilina, semeadas com as alíquotas mais diluídas das amostras, utilizadas para a contagem de bactérias lácticas, foram selecionadas em torno de quatro colônias com características visuais diferentes de cada amostra de salame. As colônias selecionadas foram repicadas em tubos com ágar MRS inclinado, incubadas em estufa por 48 h a 35°C e depois armazenadas sob refrigeração para os estudos de caracterização. Estas cepas foram reativadas a cada quatro semanas. As cepas isoladas também foram cultivadas em caldo MRS por 24 h a 35°C, após as culturas foram adicionadas de 20% de glicerol estéril e armazenadas a -18°C em tubos Eppendorf. Estas cepas foram reativadas a cada seis meses (SAMELIS et al., 1998).

### 3.4.1 Caracterização e Identificação das Cepas de Bactérias Lácticas Isoladas

Vários testes foram realizados para identificar e caracterizar as cepas de bactérias lácticas isoladas, tendo com objetivo a seleção de estirpes com características tecnológicas adequadas, para a utilização como *starter* na produção de salames fermentados. Cada cepa examinada, inicialmente, foi propagada duas vezes em caldo MRS e as culturas *overnight* foram utilizadas como inóculo para os testes de caracterização e identificação (SAMELIS; MAUROGENAKIS; METAXOPOULOS, 1994).

#### 3.4.1.1 Determinação da morfologia celular e da reação de Gram

A morfologia das células juntamente com a reação de Gram foi verificada pela visualização direta ao microscópio pelo método tradicional de coloração de Gram (PELCZAR Jr.; CHAN; KRIEG, 1996).

#### 3.4.1.2 Produção de catalase e oxidase

A verificação da produção da enzima catalase pelas cepas de bactérias lácticas foi feita adicionando gotas de peróxido de hidrogênio (3%) diretamente sobre as colônias (VILLANI et al., 1997). A presença da enzima oxidase nas culturas de bactérias lácticas foi verificada utilizando tiras de reação de oxidase (LABORCLIN).

#### 3.4.1.3 Produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

A produção de  $H_2O_2$  foi verificada em ágar MRS suplementado com 0,75% de dióxido de manganês e 0,5% de goma xantana. As placas foram incubadas por 7 dias a 25°C e examinadas diariamente para verificar a formação de zonas claras ao redor das estrias devido à produção de  $H_2O_2$  pela cultura (SAMELIS; MAUROGENAKIS; METAXOPOULOS, 1994).

#### 3.4.1.4 Produção de gás ( $CO_2$ )

A produção de gás a partir da glicose foi verificada em tubos com caldo MRS contendo tubos de Durham invertidos, substituindo o citrato de amônia do meio por sulfato de amônia, após incubação por 48 h a 35°C (GRECO et al., 2005).



#### 3.4.1.5 Produção de cápsula (dextrana)

A produção de dextrana foi determinada pelo crescimento das cepas em ágar MRS, sendo que a glicose do meio foi substituída por 5% de sacarose. As placas foram incubadas por 7 dias a 25°C e as células analisadas para verificar a presença de material capsular (HITCHENER; EGAN; ROGERS, 1982). Para observar a presença de cápsula, as células foram submetidas ao procedimento de coloração negativa pelo método de Gins (RIBEIRO; SOARES, 1993).

#### 3.4.1.6 Capacidade de acidificação

A capacidade de acidificação das cepas foi determinada em tubos com 10 ml de caldo MRS (pH 6,8), sem fosfato dipotássico e o citrato de amônia substituído por 0,3% de citrato de sódio (SHAW; HARDING, 1984). O pH foi medido em potenciômetro digital (Requipal RQ210) após incubação das culturas por 48 h a 35°C (GRECO et al., 2005).

#### 3.4.1.7 Capacidade de crescimento em diferentes valores de pH

A capacidade de crescimento das cepas de bactérias lácticas isoladas foi verificada em caldo MRS, com pH ajustado a 3, 4 e 5 com ácido clorídrico (HCl 5 mol.L<sup>-1</sup>), após 48 h de incubação a 35°C (PAPAMANOLI et al., 2003).

#### 3.4.1.8 Capacidade de crescimento em diferentes temperaturas

O crescimento em diferentes temperaturas foi verificado em caldo MRS após incubação por 72 h a 15, 35 e 45°C e incubação por 7 dias a 4°C (DROSINOS et al., 2005).

#### 3.4.1.9 Tolerância ao cloreto de sódio (NaCl) e ao cloreto de sódio associado ao nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>)

A tolerância a 5% e 8% de NaCl, e a tolerância a 3% de NaCl associado a 200 ppm de NaNO<sub>2</sub> foram testadas pela capacidade de crescimento em caldo MRS após incubação por 72 h a 35°C (HUGAS et al., 1993).

#### 3.4.1.10 Potencial probiótico

O potencial probiótico das cepas de bactérias lácticas isoladas das amostras de salames foi avaliado em relação à resistência a acidez e à tolerância aos sais biliares.

##### 3.4.1.10.1 Resistência à acidez

Para verificar a resistência à acidez, as cepas das bactérias foram reativadas por dois cultivos sucessivos em tubos com 5 ml de caldo MRS, incubados por 12-14 h a 37°C. Uma alíquota de 1 ml dessa suspensão (concentração superior a 9 log UFC) foi utilizada para inocular tubos com 9 ml de tampão fosfato salina (PBS) com pH ajustado a 3,0 utilizando HCl 5 mol.L<sup>-1</sup>. A solução de PBS foi preparada dissolvendo NaCl (9 g.l<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (9 g.l<sup>-1</sup>) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 g.l<sup>-1</sup>) em água destilada (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000). As suspensões foram incubadas em estufa por 3 horas a 37°C. Após esse período foram feitas diluições decimais em água peptonada 0,1% e a população viável foi determinada em ágar MRS, conforme descrito no item 3.3.3.

##### 3.4.1.10.2 Tolerância à bile

Para avaliar a tolerância à bile, as cepas das bactérias foram reativadas por dois cultivos sucessivos em tubos com 5 ml de caldo MRS, incubados por 12-14 h a 37°C. Em seguida, 1 ml da última cultura (concentração superior a 9 log UFC) foi utilizado para inocular tubos com 9 ml de caldo MRS adicionado de 0,3% de sais

biliares. Os tubos foram incubados por 4 h a 37°C. A tolerância à bile pelas cepas avaliadas foi verificada em placas com ágar MRS depois da incubação em estufa por 48 h a 37°C (PENNACCHIA et al., 2004).

#### 3.4.1.11 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das cepas de bactérias lácticas foi verificada por dois métodos.

##### a) Difusão por cavidade em ágar

Inicialmente, utilizando a técnica de difusão por cavidade (Figura 3) em ágar tripticase de soja (TSA), foi avaliada a capacidade inibitória pela possível ação de biocinas produzidas durante o crescimento dos isolados em caldo MRS. O caldo fermentado por 48 h a 37°C pelas diferentes cepas de bactérias lácticas foi centrifugado (4.000 rpm) e o sobrenadante foi dividido em duas partes, sendo que o pH de uma das partes foi ajustado a 6,0 (NaOH 1 N). Após, os caldos foram concentrados a 50% em rotoevaporador (Fisaton 802) a 45°C e filtrados em membrana de 0,2 µm (MUFANDAEDZA et al., 2006).

As cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) foram cultivadas em tubos com 10 ml de caldo tripticase de soja (TSB). Essas cepas patogênicas foram semeadas com o auxílio de *swab* estéril em placas de Petri contendo 15 ml de ágar Tripticase de Soja (TSA). Depois da absorção completa do inóculo pelo meio de cultura foram feitos poços de 8 mm aos quais foram adicionados 50 µl do caldo concentrado e filtrado das culturas de bactérias lácticas. As placas foram mantidas a 4°C por 3 h para permitir a difusão do caldo concentrado no meio de cultura antes do crescimento das cepas patogênicas, depois as placas foram incubadas por 24 h a 37°C. A atividade antimicrobiana foi mensurada pela zona de inibição ao redor da cavidade (MUFANDAEDZA et al., 2006).

FIGURA 3 – PLACAS UTILIZADAS PARA O TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA TÉCNICA DE DIFUSÃO POR CAVIDADE

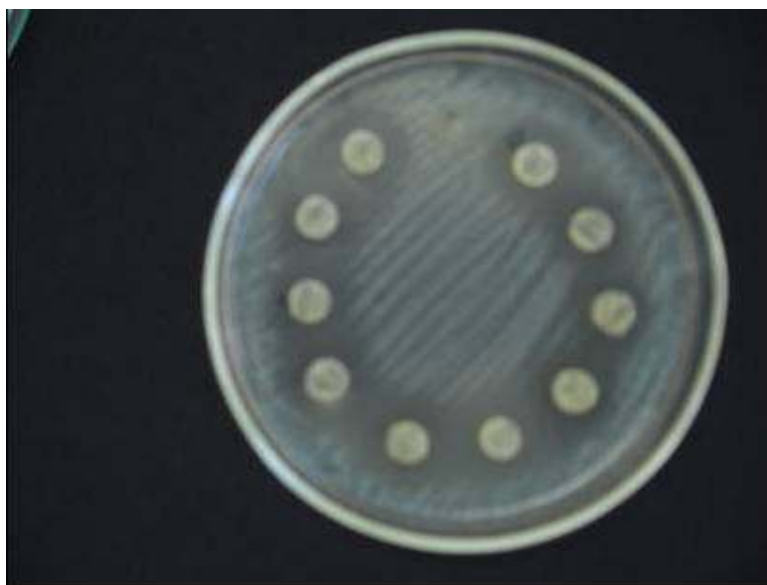


FONTE: O AUTOR.

b) Discos de ágar com as cepas de bactérias lácticas

A capacidade inibitória *in vitro* (Figura 4) das cepas de bactérias lácticas frente às estirpes patogênicas foi testada mediante adaptação do método descrito por TAGG; Mc GIVEN (1971).

FIGURA 4 – PLACA COM *Listeria monocytogenes* E OS DISCOS DE MRSA COM AS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS



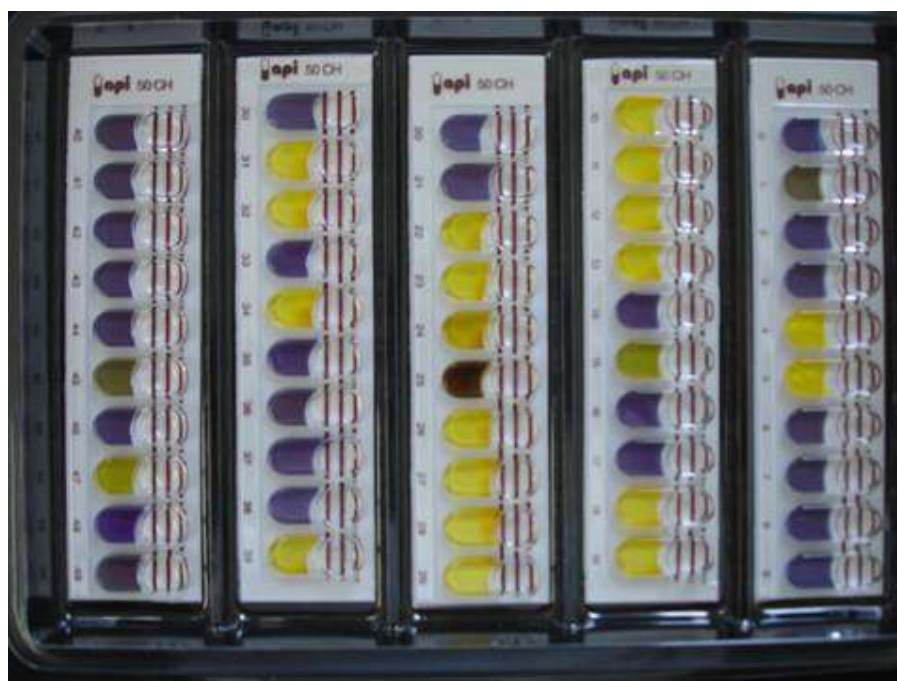
FONTE: O AUTOR.

Os discos de ágar MRS com as culturas das cepas (24 h a 37°C) de bactérias lácticas foram colocados invertidos sobre as placas inoculadas com os patógenos. O controle foi realizado utilizando discos de ágar MRS com pH 6,0. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e examinadas observando a formação de zonas de inibição. O potencial inibitório foi considerado negativo quando não houve a formação de halos de inibição do crescimento dos patógenos no ágar ao redor do disco. A atividade antagonista foi mensurada pela zona de inibição ao redor do disco de ágar MRS.

#### 3.4.1.12 Identificação bioquímica

Levando em conta as características de importância tecnológica para a utilização como *starter* na fabricação de salames, foram selecionadas 10 cepas de bactérias lácticas para a identificação bioquímica (Figura 5) pelo sistema API 50CHL (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) (GRECO et al., 2005).

FIGURA 5 – GALERIAS DO SISTEMA DE IDENTIFICAÇÃO API 50 CHL



FONTE: O AUTOR.

Para inocular as galerias, as cepas de bactérias lácticas foram cultivadas em MRSA por 24 h a 37°C. A partir da biomassa dessas placas foi feita uma densa suspensão bacteriana em tubos com água destilada estéril, que foi utilizada para inocular os tubos contendo o meio API 50 CHL com uma concentração bacteriana final equivalente a 2 na escala de MacFarland. O tubo contendo o meio API 50 CHL com a cepa da bactéria a ser identificada foi utilizado para inocular as 50 células da galeria (Figura 5).

#### 3.4.1.13 Crescimento das cepas de *Lactobacillus plantarum* 341 (Lp341) e *Lactobacillus plantarum* 503 (Lp503)

As cepas foram reativadas por dois cultivos sucessivos em tubos com 5 ml de caldo MRS, incubados por 12-14 h a 37°C. Em seguida, frascos com caldo MRS foram inoculados com 1% de inóculo (em torno de  $9 \log \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) e incubados em estufa por 24 h a 37°C. A evolução do crescimento microbiano foi monitorada nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 h de inoculação, medindo a absorbância a 600 nm usando espectrofotômetro (Spectrumlab 22PC) (PENNACCHIA et al., 2004). O crescimento das culturas também foi determinado pela contagem em placas com MRSA, conforme descrito no item 3.3.3.

#### 3.4.1.14 Produção de biomassa pelas cepas de bactérias lácticas em caldo MRS

As cepas de *Lactobacillus plantarum* 341 e 503 foram reativadas por dois cultivos sucessivos em tubos com 5 ml de caldo MRS, incubados por 12-14 h a 37°C. Frascos com caldo MRS foram inoculados com 1% de inóculo (concentração acima de  $9 \log \text{UFC}$ ) e incubados em estufa por 24 h a 37°C. O caldo fermentado foi centrifugado (4000 rpm por 15 min) e o sobrenadante desprezado. A biomassa depositada no fundo do tubo foi ressuspensa em leite desnatado estéril (10% p/v) e a temperatura de 4°C mantida até o momento da utilização na produção de salames.

### 3.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PÓLEN

A amostra de pólen (10 g) foi triturada, homogeneizada e extraída com 100 mL de etanol 70%. A extração foi feita a 70°C, em banho de água termostatizado, por 30 min sob agitação constante. Após a filtração em papel de filtro Watman nº 5, o filtrado obtido foi seco em evaporador rotativo sob pressão reduzida. O extrato obtido foi utilizado para elaborar uma solução aquosa com 400 ppm.

A quantidade do extrato de pólen, adicionada na massa cárnea para a elaboração da partida de salame (tratamento 4), foi baseada em experimento realizado para testar a atividade antioxidante do extrato de alecrim e de orégano em hambúrgueres (TRINDADE, 2007).

### 3.6 EXPERIMENTO PARA AVALIAR O EFEITO DAS CULTURAS *STARTER* DE *Lactobacillus plantarum* 341 E 503 NA PRODUÇÃO DE SALAMES

Para testar o efeito das culturas lácticas isoladas foram feitas partidas de salames empregando uma formulação padrão de salame tipo italiano. A formulação utilizada está descrita no Quadro 1.

QUADRO 1 – FORMULAÇÃO PADRÃO DE SALAME TIPO ITALIANO UTILIZADA PARA TESTAR AS CEPAS DE *Lactobacillus plantarum* 341 E 503

MATÉRIA-PRIMA	QUANTIDADE (%)
Carne suína	60
Carne bovina	20
Toucinho	20
INGREDIENTES	(g/kg de massa cárnea)
Sal	25
Glicose	5,0
Sacarose	5,0
Fixador A-80 (sacarose, eritorbato de sódio)	2,5
Pimenta branca	2,0
Alho	3,0
Noz moscada	0,2
Sais de cura (Qualicura - Germinal) (nitrito e nitrato de sódio)	3,0

FONTE: TERRA, 1998.

Além de testar as culturas lácticas isoladas de salames produzidos por fermentação espontânea, também foi utilizado extrato de pólen em uma das partidas de

salames com o objetivo de verificar seu potencial antioxidante. O experimento implantado foi constituído por quatro partidas de salames, conforme descrito no Quadro 2.

QUADRO 2 – PARTIDAS DE SALAMES PRODUZIDAS PARA TESTAR AS CEPAS DE *Lactobacillus plantarum* 503 E 341 E O POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE PÓLEN

PARTIDAS DE SALAMES	COMPOSIÇÃO
Tratamento 1 (Controle)	Formulação padrão adicionada da cultura <i>starter</i> comercial Floracarn SPX (Chr. Hansen), conforme indicação do fabricante, composta pelos microrganismos <i>Pediococcus pentosaceus</i> e <i>Staphylococcus xylosus</i> .
Tratamento 2 (Lp503)	Formulação padrão adicionada das culturas de <i>Lactobacillus plantarum</i> 503 (7 log UFC.g <sup>-1</sup> ) e a cultura comercial Floracarn SX (Chr. Hansen), contendo o microrganismo <i>Staphylococcus xylosus</i> (adição conforme indicação do fabricante).
Tratamento 3 (Lp341)	Formulação padrão adicionada das culturas de <i>Lactobacillus plantarum</i> 341 (7 log UFC.g <sup>-1</sup> ) e a cultura comercial Floracarn SX (Chr. Hansen), contendo o microrganismo <i>Staphylococcus xylosus</i> (adição conforme indicação do fabricante).
Tratamento 4 (Lp341+pólen)	Formulação padrão (exceto fixador A-80) adicionada das culturas de <i>Lactobacillus plantarum</i> 341 e a cultura comercial Floracarn SX (Chr. Hansen), contendo o microrganismo <i>Staphylococcus xylosus</i> (adição conforme indicação do fabricante). Adição de 1% da solução de extrato de pólen (400 ppm) como antioxidante.

### 3.6.1 Procedimento Utilizado Para a Elaboração dos Salames

Para a elaboração dos salames foi utilizado carne bovina e suína refrigeradas, sendo que o toucinho estava congelado. Para o preparo da massa, inicialmente a carne bovina foi moída em disco de 5 mm e a carne suína em disco de 10 mm. O toucinho congelado foi picado manualmente em cubos no tamanho desejado (inferior a 5 mm) e armazenado em condições de congelamento.

Para a obtenção da massa dos salames, as carnes e o toucinho foram levados à misturadeira (Jamar MJI 35) e adicionados dos ingredientes comuns a todos os tratamentos (TERRA, 1998). Depois de concluída a mistura, a massa cárnea foi dividida em quatro porções, cada porção foi adicionada de suas respectivas culturas *starter*, conforme os tratamentos citados no Quadro 2. A massa cárnea de cada



tratamento foi embutida (Embutideira Jamar EJI-09) manualmente em tripa natural suína com diâmetro entre 45 e 55 mm.

### 3.6.2 Condições Utilizadas na Câmara de Maturação Durante a Produção dos Salames

Após identificação das unidades de cada tratamento, as peças de salames foram acomodadas na câmara de maturação (Menocin) com temperatura e a umidade relativa controladas (Figura 6).

FIGURA 6 – SALAMES ACONDICIONADOS NA CÂMARA DE MATURAÇÃO DURANTE O PROCESSAMENTO



FONTE: O AUTOR.

As condições utilizadas na câmara de maturação durante o processamento dos salames estão descritas na Tabela 3. As amostras foram mantidas na câmara climatizada até atingir o valor de  $A_w$  de 0,87, parâmetro utilizado para concluir a fabricação (TERRA, 1998).

TABELA 3 – CONDIÇÕES UTILIZADAS NA CÂMARA CLIMATIZADA DURANTE A PRODUÇÃO DOS SALAMES TIPO ITALIANO

TEMPO (DIAS)	TEMPERATURA (°C)	UMIDADE RELATIVA (%)
1	25	95
2	24	93
3	23	90
4	22	85
5	21	80
6	20	75
7	18	75
↓	↓	↓
14	18	75

FONTE: TERRA, 1998.

Concluída a fabricação dos salames, as peças foram embaladas a vácuo (Selovac 200B) e armazenadas ao abrigo da luz em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 3$ ). Esses salames foram utilizados para realizar a avaliação sensorial e a caracterização físico-química com o objetivo de verificar se o produto atende os padrões qualidade, estabelecidos pela legislação para salame tipo italiano (BRASIL, 2000).

### 3.7 ACOMPANHAMENTO DO PROCESSAMENTO DOS SALAMES

ELABORADOS COM CULTURAS *STARTER* DE *Lactobacillus plantarum* 503 E 341

Com o objetivo de acompanhar a evolução da microbiota de interesse e as alterações que ocorrem nas características físico-químicas dos salames durante o processamento, foram coletadas amostras para análise nos tempos 0, 3, 7 e 14 dias.

Para acompanhar o desenvolvimento dos *starter* adicionados, bem como da microbiota nativa da massa cárnea foram feitas as seguintes determinações microbiológicas: contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e/ou facultativas, contagem de bactérias lácticas, contagem de *Staphylococcus* totais e *Staphylococcus* coagulase positiva e contagem de coliformes totais e fecais. Essas determinações foram feitas de acordo com as metodologias descritas no item 3.3.

As alterações nas características físico-químicas dos salames durante o período de fermentação/maturação foram verificadas pelas seguintes determinações:

Aw, pH (conforme descrito no item 3.2); quebra de peso, cor e, oxidação lipídica pela reação de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico).

### 3.7.1 Determinação da Cor dos Salames

Para a medição da cor foi utilizado o equipamento Minolta Chroma Meter CR-300 (Minolta Câmera Co., Osaka, Japan). Inicialmente as amostras de salames foram trituradas e logo após foram feitas três medições, onde “L\*” corresponde ao brilho, “a\*” ao índice de cor vermelha e “b\*” ao índice de cor amarela.

### 3.6.2 Determinação da Perda de Peso dos Salames

A perda de peso foi determinada pela diferença entre o peso inicial (logo após o embutimento) e o peso final das peças de salames.

### 3.6.3 Determinação da Oxidação Lipídica

A oxidação lipídica foi determinada nos tempos 0, 3, 7, 14, 45, 90 e 105 dias pelo método de TBARS modificado de acordo com o descrito por RAHARJO; SOFOS; SCHMIDT (1992).

### 3.6.4 Caracterização Físico-Química Após o Processamento

A caracterização físico-química foi feita no produto final (14º dia) com o objetivo de verificar se o produto atende aos Padrões de Qualidade, estabelecidos pela legislação para salame tipo italiano (BRASIL, 2000). Dessa forma, foi medido o valor da Aw e o teor de umidade, proteínas e gordura, conforme descrito no item 3.2.

### 3.7 AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS SALAMES TIPO ITALIANO PRODUZIDOS COM AS CULTURAS *STARTER* DE *Lactobacillus plantarum* 503 E 341

Para verificar o efeito da adição das culturas de *Lactobacillus plantarum* 503 e 341 sobre as características sensoriais dos salames foi realizado um teste sensorial com o produto. A avaliação sensorial foi feita por alunos (33) do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, consumidores desse tipo de produto, com conhecimento da utilização da análise sensorial como ferramenta para avaliar novos produtos.

Para avaliar os atributos das amostras de salames, dos diferentes tratamentos, foi utilizada uma escala estruturada mista (nove pontos) com a intensidade de cada atributo a ser avaliado. Também foi solicitado aos provadores para ordenar as amostras de acordo com sua preferência. A ficha utilizada para a avaliação sensorial está contida no Quadro 3.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E NA AVALIAÇÃO SENSORIAL

Os resultados obtidos na caracterização físico-química e microbiológica das amostras de salames coletadas de diferentes fabricantes produzidas por fermentação espontânea foram submetidos ao cálculo da média e do desvio padrão. Já os dados coletados durante o processamento e armazenamento dos salames e os dados obtidos na avaliação sensorial foram submetidos ao cálculo da média e análise de variância. Quando pela análise de variância foi verificada diferença entre as amostras foi realizado o teste de Tukey para a comparação das médias ( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 4.00.255 (GraphPad software, Inc.)

Os dados do teste de ordenação das amostras de acordo com a preferência foram analisados pelo teste de Friedman (DUTCOSKY, 2007).

**QUADRO 3 – FICHA UTILIZADA NA AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS AMOSTRAS DE SALAMES**

NOME: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_\_

Você está recebendo amostras de salames produzidos com bactérias lácticas selecionadas de produtos cárneos fermentados. Utilize a escala abaixo para avaliar os atributos e anote o valor de sua avaliação para cada amostra na tabela a seguir.

**Atributos de qualidade:**

**GOSTO ÁCIDO**

1\_\_\_\_2\_\_\_\_3\_\_\_\_4\_\_\_\_5\_\_\_\_6\_\_\_\_7\_\_\_\_8\_\_\_\_9  
Fraco moderado forte

**SABOR**

1\_\_\_\_2\_\_\_\_3\_\_\_\_4\_\_\_\_5\_\_\_\_6\_\_\_\_7\_\_\_\_8\_\_\_\_9  
Ruim intermediário bom

**AROMA**

1\_\_\_\_2\_\_\_\_3\_\_\_\_4\_\_\_\_5\_\_\_\_6\_\_\_\_7\_\_\_\_8\_\_\_\_9  
Ruim intermediário bom

**COR**

1\_\_\_\_2\_\_\_\_3\_\_\_\_4\_\_\_\_5\_\_\_\_6\_\_\_\_7\_\_\_\_8\_\_\_\_9  
Fracá intermediária forte

**TEXTURA**

1\_\_\_\_2\_\_\_\_3\_\_\_\_4\_\_\_\_5\_\_\_\_6\_\_\_\_7\_\_\_\_8\_\_\_\_9  
Suave intermediária firme

**ASPECTO (APARÊNCIA VISUAL)**

1\_\_\_\_2\_\_\_\_3\_\_\_\_4\_\_\_\_5\_\_\_\_6\_\_\_\_7\_\_\_\_8\_\_\_\_9  
Ruim intermediário bom

Atributos	Amostra 251	Amostra 916	Amostra 581	Amostra 232
<b>Gosto ácido</b>				
<b>Sabor</b>				
<b>Aroma</b>				
<b>Cor</b>				
<b>Textura</b>				
<b>Aspecto</b>				

**Ordene as amostras de acordo com sua preferência**

1º: \_\_\_\_\_ 2º: \_\_\_\_\_ 3º: \_\_\_\_\_ 4º: \_\_\_\_\_

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE SALAMES ELABORADOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Os resultados das análises referentes aos parâmetros físico-químicos e à composição aproximada, das cinquenta amostras de salames de diferentes fabricantes, estão apresentados na Tabela 4.

#### 4.1.1 Valores do pH das Amostras de Salames

Entre os fatores que interferem no desenvolvimento dos microrganismos estão o pH e a  $A_w$ , sendo assim estão relacionados com a estabilidade dos alimentos e conseqüentemente na determinação da vida-de-prateleira (CICHOSKI; TERRA; FREITAS, 2004). Em alguns países, o valor do pH dos salames é um dos critérios utilizados para o controle de sua qualidade (BOZKURT; ERKMEN, 2002), entretanto, no Brasil, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame (BRASIL, 2000) não utiliza o valor do pH como parâmetro de controle.

A redução do pH em salames é ocasionada pela ação de bactérias lácticas sobre os açúcares com conseqüente produção de ácido láctico. Nas amostras analisadas, as medidas de pH ficaram entre 4,35 e 6,92 (Tabela 4). Salames que apresentam pH dentro dessa faixa pode ocorrer o crescimento de *Staphylococcus aureus*, responsável por parte das intoxicações alimentares vinculadas por estes produtos (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

TABELA 4 – VALORES MÉDIOS DE pH, aw, UMIDADE, CINZAS, LIPÍDEOS, PROTEÍNAS E RELAÇÃO UMIDADE/PROTEÍNA DE CINQUENTA AMOSTRAS DE SALAMES PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

continua

	pH	aw	UMIDADE (%)	CINZAS (%)	LIPÍDEOS (%)	PROTEÍNAS (%)	UMIDADE/ PROTEÍNA
1	4,94 ±0,04	0,92 ±0,002	41,96 ±0,09	5,07 ±0,14	27,43 ±0,50	21,28 ±0,10	1,97 ±0,01
2	4,68 ±0,03	0,95 ±0,002	49,01 ±0,09	3,76 ±0,01	28,80 ±0,55	15,24 ±0,10	3,22 ±0,04
3	5,56 ±0,04	0,93 ±0,003	24,91 ±0,33	4,09 ±0,01	40,22 ±0,72	16,49 ±0,25	2,18 ±0,04
4	5,56 ±0,03	0,85 ±0,003	24,58 ±0,11	4,62 ±0,03	48,83 ±0,37	16,79 ±0,30	1,46 ±0,02
5	5,81 ±0,04	0,95 ±0,002	44,65 ±0,40	3,82 ±0,15	34,12 ±1,68	14,42 ±0,40	3,10 ±0,07
6	6,92 ±0,02	0,93 ±0,003	38,65 ±0,55	4,13 ±0,33	36,49 ±0,94	17,28 ±0,31	2,24 ±0,04
7	6,37 ±0,03	0,95 ±0,002	35,02 ±0,23	3,96 ±0,10	48,42 ±0,99	11,32 ±0,31	3,10 ±0,07
8	5,63 ±0,02	0,94 ±0,001	42,02 ±0,24	5,27 ±0,10	33,10 ±0,70	17,67 ±0,34	2,38 ±0,03
9	5,83 ±0,01	0,94 ±0,001	49,86 ±0,17	4,88 ±0,06	23,93 ±0,41	19,49 ±0,27	2,56 ±0,03
10	6,02 ±0,03	0,95 ±0,001	54,37 ±0,25	5,05 ±0,04	23,20 ±0,29	16,18 ±0,29	3,36 ±0,06
11	5,36 ±0,03	0,85 ±0,002	33,93 ±0,19	6,75 ±0,05	19,44 ±0,26	37,02 ±0,25	0,92 ±0,01
12	5,43 ±0,02	0,93 ±0,002	45,94 ±0,52	5,59 ±0,05	20,25 ±0,32	26,13 ±0,39	1,76 ±0,03
13	6,21 ±0,01	0,88 ±0,003	34,11 ±0,07	7,44 ±0,13	24,55 ±0,12	25,73 ±0,39	1,33 ±0,07
14	5,83 ±0,13	0,92 ±0,003	40,91 ±0,07	5,68 ±0,09	24,95 ±0,21	23,46 ±1,31	1,74 ±0,02
15	6,11 ±0,02	0,94 ±0,003	40,00 ±0,11	4,50 ±0,14	31,32 ±0,40	20,00 ±0,26	2,04 ±0,02
16	5,80 ±0,14	0,86 ±0,002	34,95 ±0,16	6,40 ±0,21	30,97 ±0,43	27,97 ±0,15	1,25 ±0,01
17	6,59 ±0,08	0,88 ±0,004	42,07 ±0,14	6,13 ±0,16	24,83 ±0,17	24,51 ±0,44	1,72 ±0,01
18	6,67 ±0,01	0,91 ±0,004	39,90 ±0,12	4,38 ±0,11	33,40 ±0,69	19,52 ±0,25	2,04 ±0,02
19	6,50 ±0,12	0,84 ±0,005	42,55 ±0,18	8,42 ±0,04	7,44 ±0,26	39,05 ±0,12	1,09 ±0,02
20	5,81 ±0,04	0,93 ±0,003	42,53 ±0,17	5,73 ±0,06	25,36 ±0,14	23,51 ±0,45	1,81 ±0,01
21	4,85 ±0,08	0,92 ±0,002	43,56 ±0,19	5,05 ±0,08	24,38 ±0,37	20,42 ±0,21	2,13 ±0,02
22	5,46 ±0,02	0,88 ±0,002	43,10 ±0,19	6,94 ±0,05	15,64 ±0,06	30,81 ±0,23	1,40 ±0,01
23	4,86 ±0,01	0,88 ±0,002	36,32 ±0,27	5,40 ±0,10	26,50 ±0,17	26,29 ±0,12	1,38 ±0,01
24	4,54 ±0,04	0,91 ±0,002	41,18 ±0,07	4,31 ±0,02	26,94 ±0,26	22,28 ±0,18	1,85 ±0,02
25	6,21 ±0,01	0,88 ±0,002	39,79 ±0,04	6,93 ±0,35	11,60 ±0,05	36,49 ±0,27	1,09 ±0,01
26	6,42 ±0,02	0,89 ±0,002	33,43 ±0,11	7,40 ±0,33	27,84 ±0,33	27,78 ±0,37	1,20 ±0,04
27	5,52 ±0,01	0,91 ±0,001	36,86 ±0,53	8,84 ±0,45	10,99 ±0,42	41,27 ±0,49	0,89 ±0,01
28	6,21 ±0,05	0,89 ±0,002	43,68 ±0,15	6,59 ±0,10	17,30 ±0,33	29,98 ±0,54	1,46 ±0,01
29	6,22 ±0,03	0,93 ±0,003	36,18 ±0,06	5,78 ±0,13	30,90 ±0,76	24,93 ±0,15	1,45 ±0,03
30	6,23 ±0,02	0,88 ±0,003	25,10 ±0,13	5,89 ±0,13	35,41 ±2,03	27,33 ±0,37	0,92 ±0,01
31	5,58 ±0,07	0,81 ±0,003	30,18 ±0,07	6,63 ±0,12	31,65 ±0,28	27,94 ±0,13	1,08 ±0,01
32	5,46 ±0,12	0,87 ±0,003	33,00 ±0,48	5,28 ±0,02	34,13 ±0,62	22,55 ±0,73	1,46 ±0,07
33	5,31 ±0,06	0,85 ±0,003	38,47 ±0,10	7,41 ±0,03	19,86 ±0,14	29,62 ±0,62	1,30 ±0,03
34	6,13 ±0,03	0,89 ±0,003	39,05 ±0,06	6,11 ±0,03	23,67 ±0,50	27,43 ±0,15	1,42 ±0,01
35	5,46 ±0,10	0,86 ±0,003	26,91 ±0,16	5,93 ±0,21	38,01 ±0,26	25,50 ±0,19	1,06 ±0,00
36	5,83 ±0,02	0,88 ±0,003	34,98 ±0,44	6,85 ±0,10	31,28 ±0,28	22,44 ±0,51	1,56 ±0,02
37	5,06 ±0,04	0,86 ±0,003	36,11 ±0,09	6,52 ±0,04	23,17 ±0,17	28,38 ±0,50	1,27 ±0,03
38	5,44 ±0,03	0,84 ±0,003	37,96 ±0,15	6,96 ±0,01	23,52 ±0,27	29,61 ±0,11	1,28 ±0,01
39	6,36 ±0,03	0,80 ±0,003	28,82 ±0,51	7,30 ±0,04	30,57 ±0,23	27,60 ±0,09	1,04 ±0,02
40	5,88 ±0,03	0,87 ±0,003	34,32 ±0,14	6,34 ±0,10	27,68 ±0,18	27,49 ±0,53	1,25 ±0,03
41	6,02 ±0,10	0,86 ±0,003	20,97 ±1,07	8,08 ±0,10	41,53 ±0,29	22,64 ±0,43	0,93 ±0,03
42	5,18 ±0,05	0,83 ±0,003	22,70 ±0,15	8,30 ±0,03	33,20 ±0,76	32,38 ±0,71	0,70 ±0,01
43	5,99 ±0,02	0,89 ±0,003	30,20 ±0,11	6,90 ±0,05	31,58 ±1,52	28,43 ±0,27	1,06 ±0,01
44	5,68 ±0,02	0,89 ±0,003	31,20 ±0,20	6,84 ±0,06	30,06 ±0,42	27,33 ±0,40	1,14 ±0,01
45	6,03 ±0,03	0,90 ±0,003	40,00 ±0,24	4,49 ±0,06	28,56 ±0,14	23,92 ±0,25	1,68 ±0,03
46	4,35 ±0,02	0,89 ±0,003	44,73 ±0,15	6,12 ±0,06	18,52 ±0,06	24,75 ±0,56	1,81 ±0,03

TABELA 4 – VALORES MÉDIOS DE pH, aw, UMIDADE, CINZAS, LIPÍDEOS, PROTEÍNAS E RELAÇÃO UMIDADE/PROTEÍNA DE CINQUENTA AMOSTRAS DE SALAMES PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

	pH	aw	UMIDADE (%)	CINZAS (%)	LIPÍDEOS (%)	PROTEÍNAS (%)	conclusão UMIDADE/ PROTEÍNA
47	5,85±0,09	0,91±0,003	40,00 ±0,39	4,89 ±0,04	28,52 ±0,29	22,13 ±0,58	1,81 ±0,06
48	5,90±0,02	0,86±0,002	33,06 ±0,34	6,08 ±0,10	34,14 ±0,08	20,84 ±0,30	1,59 ±0,03
49	5,93±0,03	0,93±0,001	55,11 ±0,07	4,91 ±0,05	14,01 ±0,08	24,19 ±0,18	2,28 ±0,02
50	6,00±0,02	0,88±0,003	37,04 ±0,08	5,29 ±0,11	31,38 ±0,04	24,04 ±0,48	1,54 ±0,03
Média	5,75	0,89	37,52	5,92	27,79	24,80	1,63
mínimo	4,35	0,80	20,97	3,76	7,44	11,32	0,70
máximo	6,92	0,95	55,11	8,84	48,83	41,27	3,36
CV %	9,66	0,04	19,98	21,50	30,77	24,97	38,31

#### 4.1.2 Atividade de Água (aw) das Amostras de Salames

A Aw é um dos fatores mais relevantes para a multiplicação microbiana e conseqüentemente para a estabilidade dos alimentos. Para o parâmetro Aw nas amostras avaliadas, os valores obtidos variaram de 0,80 a 0,95 (Tabela 4), sendo que 13 amostras (26%) apresentaram valores acima de 0,92 (Figura 7-A), valor máximo aceitável para a Aw segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame (BRASIL, 2000).

#### 4.1.3 Classificação das Amostras em Relação aos Valores de pH e de Aw

De acordo com os valores do pH e da Aw, os produtos cárneos podem ser classificados em “facilmente perecíveis”, “perecíveis” e “estáveis” (LEISTNER; ROEDEL, 1975 citado por AMBROSIADIS et al., 2004). Levando em conta essa classificação, 68% das amostras de salames avaliadas foram consideradas estáveis (pH <5,2 e Aw <0,95 ou somente o pH <5,0 ou a Aw <0,91). Esta estabilidade relaciona-se a alterações microbianas indesejáveis e produtos com tais características não necessitam de armazenamento sob refrigeração. A vida-de-prateleira de salames classificados como estáveis é determinada principalmente por deteriorações químicas e físicas, como a rancificação e a descoloração (AMBROSIADIS et al., 2004).



Na categoria de perecíveis foram classificadas 32% das amostras (pH de 5,2-5,0 ou  $A_w$  de 0,95 a 0,91). Dessa forma, já que o pH e a  $A_w$  não foram barreiras suficientes para proporcionar a estabilidade dos produtos, existe a necessidade da aplicação de mais obstáculos ao desenvolvimento microbiano. Produtos cárneos incluídos nessa categoria necessitam de armazenamento à temperatura de 10°C ou inferior. Nenhuma das amostras apresentou características que as enquadrasse como facilmente perecíveis (pH >5,2 e  $A_w$  >0,95). Produtos cárneos classificados na categoria de “facilmente perecíveis” necessitam de armazenamento em temperatura de 5°C ou inferior.

#### 4.1.4 Teor de Umidade das Amostras de Salames

A desidratação que ocorre durante o processamento dos salames ocasiona a diminuição da quantidade de água, com conseqüente aumento do teor de proteínas e lipídeos (SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005), redução que contribui para a estabilidade dos produtos (SAMELIS et al., 1998). O conteúdo de umidade das amostras analisadas, conforme apresentado na Tabela 4, variou de 20,97% a 55,11%. Para que os salames estejam em conformidade com a legislação brasileira, as amostras devem apresentar um teor máximo de 40% de umidade e, assim sendo, 34% das amostras estavam em desacordo por possuírem quantidades acima do limite (Figura 7-A).

LORENZO et al. (2000), estudando as características físico-químicas de dois tipos de salames tradicionais da Espanha, encontraram teores de umidade bastante variáveis. No tipo denominado de “Androlla”, a quantidade de água variou de 28,9% a 55,1%; para o tipo denominado de “Botillo”, a variação foi de 44,8% a 62,2%. Já em estudo realizado por AMBROSIADIS et al. (2004), em salames tradicionais da Grécia, as amostras apresentaram teores de água na faixa de 33,73% a 64,40%.

A redução da umidade e conseqüentemente da  $A_w$ , assim como o desenvolvimento da textura e do *flavour*, ocorrem durante a etapa de maturação (FERNÁNDEZ et al., 2000). A diminuição da umidade depende de fatores internos e

externos, bem como de uma fermentação láctica eficiente e do tempo de maturação (SANZ et al., 1997; COMI et al., 2005; SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005). Observando a data de fabricação dos salames analisados, verificou-se que algumas amostras tinham sido produzidas recentemente, portanto não sofreram uma fermentação completa e conseqüentemente não passaram pelo processo de maturação. Esse fato pode justificar a grande variação na composição aproximada das amostras, como também nos valores de pH e de  $A_w$ .

#### 4.1.5 Resíduo Mineral Fixo das Amostras de Salames

Em relação ao resíduo mineral fixo, os teores das amostras ficaram entre 3,76% a 8,84%. Em parte, essa grande variação nos teores de cinzas está relacionada com as variações no teor de umidade das amostras. A quantidade de sal utilizada nas formulações dos salames também pode contribuir para a elevação da quantidade de cinzas no produto. Em estudo realizado para quantificar os componentes e caracterizar salames tradicionais da Grécia, os teores de cinza encontrados ficaram entre 2,13% a 5,07% (AMBROSIADIS et al., 2004).

#### 4.1.6 Teor de Proteínas das Amostras de Salames

As proteínas são importantes constituintes dos salames, tanto pelo aspecto nutricional como por suas propriedades tecnológicas. As proteínas são os principais componentes estruturais e funcionais de carnes processadas (IBÁÑEZ et al., 1997). Nas amostras analisadas houve uma grande variação em relação ao conteúdo protéico, a amostra com menor teor apresentou 11,32% e a maior 41,27% de proteínas. O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame (BRASIL, 2000) fixa para proteínas a quantidade mínima de 20%, sendo assim 20% das amostras estavam com teor inferior ao recomendado (Figura 7-A).

#### 4.1.7 Relação Umidade/Proteínas das Amostras de Salames

Durante o processamento, os salames sofrem uma desidratação parcial tendo como consequência a redução na relação umidade proteína. A relação umidade/proteínas teve uma grande variação (Coeficiente de Variação 38,38%) entre as amostras analisadas (Tabela 4), apresentando valores entre 0,70 e 3,36. AMBROSIADIS et al. (2004) obtiveram valores entre 1,71 e 4,12 para a relação umidade/proteína avaliando 67 amostras de salames típicos da Grécia. Esses autores citaram alguns estudos realizados onde os valores da relação umidade/proteína são bastante variáveis, em média superiores aos encontrados neste trabalho. Também citam que tem sido sugerido por pesquisadores que a relação umidade/proteína seja utilizada como um sistema de classificação para salames, uma forma a mais de garantir a qualidade desses produtos.

#### 4.1.8 Teor de Gordura das Amostras de Salames

Organizações ligadas à saúde pública têm adotado políticas que estimulam as pessoas na escolha de uma alimentação mais saudável, pela redução da quantidade de calorias ingeridas, de gorduras saturadas e de colesterol, com o objetivo de prevenir doenças cardiovasculares. Entretanto, a gordura é um componente com função tecnológica importante na produção de salames, sendo essencial para o desenvolvimento do sabor, do aroma e da textura final desses produtos (SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005). Estudos relatam a utilização de diferentes quantidades de gordura na produção de salames e o consequente efeito sobre as características físicas, a composição química e a aceitação sensorial dos salames (NASSU; GONÇALVES; BESERRA, 2002; AMBROSIADIS et al., 2004; SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005).

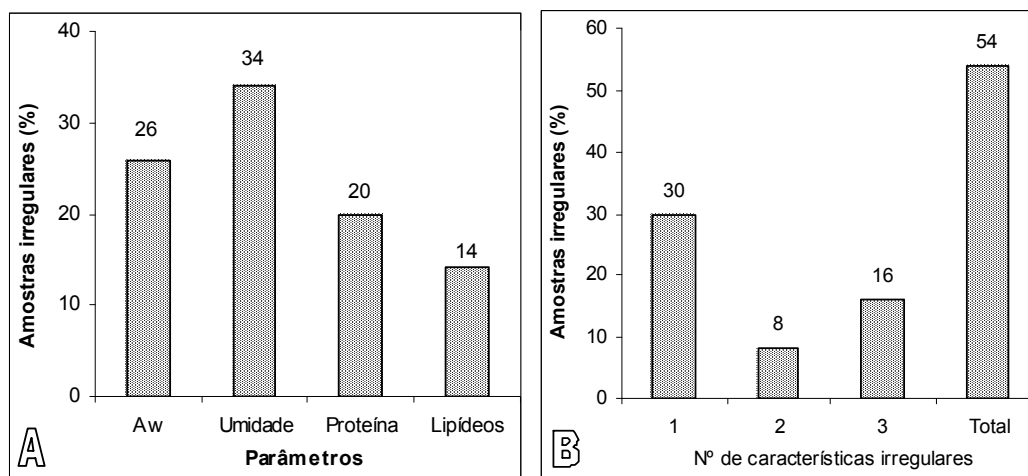
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, o teor de gordura das amostras de salames avaliadas variou de 7,44% a 48,83%. Em relação à quantidade de gordura, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame (BRASIL,

2000) estipula o teor máximo em 35%. Dessa forma, das amostras analisadas, sete (14%) apresentavam quantidades acima deste limite (Figura 7-A). Entre as características avaliadas, o teor de gordura foi o que teve maior variabilidade com um coeficiente de variação de 30,77%.

#### 4.1.9 Quantidade de Amostras Irregulares em Relação às Características Físico-Químicas Avaliadas

Várias amostras apresentaram uma ou mais característica fora dos limites aceitáveis, quando comparadas com os valores estipulados pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame (Figura 7 A e B).

FIGURA 7 – (A) QUANTIDADE DE AMOSTRAS IRREGULARES EM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS  $a_w$ , UMIDADE, PROTEÍNAS E GORDURA; (B) QUANTIDADE DE AMOSTRAS EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS IRREGULARES



Pelos resultados obtidos das amostras de salames avaliadas, verificou-se que existe uma grande variação na composição química e nos parâmetros físicos entre amostras de salame elaboradas pelas pequenas indústrias. Isso pode ser devido a diferentes estágios de fermentação/maturação das amostras ou por não serem respeitadas nas formulações as quantidades dos principais constituintes utilizados na fabricação dos salames.

Em última análise, com relação aos parâmetros físico-químicos avaliados, apenas 46% das amostras de salames estão de acordo com os valores máximos ou mínimos fixados pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Salame (BRASIL, 2000), indicando a necessidade da implantação de programas e uma maior fiscalização que objetivem a padronização desses produtos, de modo a proporcionar aos consumidores um alimento seguro e de qualidade.

#### 4.2 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE SALAMES ELABORADOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Os resultados das análises microbiológicas das amostras de salames estão apresentados na Tabela 5. Em salames produzidos por fermentação espontânea, método de produção utilizado pela grande maioria das pequenas indústrias do Brasil, a qualidade microbiológica da matéria-prima é fator fundamental, bem como a presença de uma microflora nativa capaz de transformar a matéria-prima em produto final adequado.

O estudo da ecologia de salames fermentados se faz necessário para entender as mudanças físicas e químicas que ocorrem durante a fermentação e maturação. A microbiota que se desenvolve nos salames é em grande parte responsável pela formação das características do produto final. Pesquisas para estudar salames obtidos por fermentação espontânea são realizadas principalmente em produtos típicos da Grécia, Espanha e Itália. Esses estudos visam identificar e quantificar a população microbiana que se desenvolve durante as diferentes etapas do processamento ou do produto final. Também são realizados estudos para identificar isolados de bactérias lácticas, estafilococos não patogênicos, bolores e leveduras de salames produzidos por fermentação espontânea e selecionar estirpes com características metabólicas e fisiológicas adequadas para a utilização como *starter* (SANZ et al., 1997; SAMELIS et al., 1998; SANTOS et al., 1998; COPPOLA et al., 2000; PAPAMANOLI et al., 2002; AMBROSIADIS et al., 2004; MORETTI et al., 2004; COMI et al., 2005).

#### 4.2.1 Quantidade de Bactérias Aeróbias Mesófilos e/ou Facultativas

A quantidade total de aeróbios mesófilos nas amostras de salames avaliadas foi bastante variável, sendo que na maioria, a concentração ficou acima de 6 log UFC.g<sup>-1</sup> (Tabela 5). AMBROSIADIS et al. (2004) avaliando 67 amostras de salames tradicionais da Grécia, encontraram valores médios para aeróbios mesófilos de 8 log UFC.g<sup>-1</sup>, com um mínimo de 5 log UFC.g<sup>-1</sup> e um máximo próximo a 9 log UFC.g<sup>-1</sup>.

A massa cárnea utilizada na produção de salames pode apresentar uma microbiota bastante variável, também pode ocorrer variação no tamanho da população inicial da massa, sendo que as diferenças iniciais nem sempre são observadas no produto final. Em estudos para caracterizar salames fermentados típicos italianos, a contagem total aumentou durante a maturação e os valores ficaram próximos de 7 log UFC.g<sup>-1</sup> a 9 log UFC.g<sup>-1</sup> no produto final (MORETTI et al., 2004; COMI et al., 2005). Os microrganismos que fazem parte da massa inicial são provenientes da matéria-prima, dos condimentos, bem como dos utensílios e do ambiente de processamento (HOLZAPFEL, 2002; COMI et al., 2005).

As condições de processamento e a adição de culturas *starter* resultam em produtos finais com concentrações microbianas diferentes. Nas amostras de salames analisadas, a contagem total de aeróbios mesófilos foi similar à contagem de bactérias lácticas, isso confirma a predominância desse grupo de microrganismos nesses produtos (SANZ et al., 1997). Em estudo realizado para avaliar os efeitos da adição de culturas *starter* e de aditivos na qualidade de salame, a contagem de aeróbios totais aumentou durante os primeiros dias de maturação se mantendo em valores próximos a 8 log UFC.g<sup>-1</sup> no final da maturação, sendo que a adição de aditivos e de culturas *starter* interferiu na quantidade de aeróbios totais (BOZKURT; ERKMEN, 2002).

Em salames típicos da Turquia (*Sucuks*) obtidos por fermentação espontânea, as variações na quantidade de gordura adicionada nas formulações e a temperatura de processamento alteraram significativamente a contagem total, sendo que no produto final a concentração ficou em torno de 8 log UFC.g<sup>-1</sup> (SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005).

TABELA 5 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE 50 AMOSTRAS DE SALAMES ELABORADOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

	PCA	MRS	MSA	DRBC	BP	VB	EC	EC-MUG
1	8,48 ±0,08	6,65 ±0,06	6,58 ±0,06	5,95 ±0,02	<1	<3	<3	<3
2	8,36 ±0,07	6,64 ±0,08	7,57 ±0,03	6,20 ±0,09	<1	93	93	43
3	8,04 ±0,06	5,73 ±0,01	7,46 ±0,02	6,81 ±0,01	<1	23	<3	<3
4	7,52 ±0,11	6,49 ±0,07	7,40 ±0,02	4,56 ±0,04	<1	43	7	7
5	8,40 ±0,01	6,77 ±0,10	6,61 ±0,08	6,08 ±0,01	<1	9	<3	<3
6	5,95 ±0,01	4,24 ±0,34	6,61 ±0,08	3,68 ±0,09	4,15 ±0,20	<3	<3	<3
7	5,00 ±0,01	5,00 ±0,01	5,70 ±0,04	2,00 ±0,01	3,72 ±0,17	<3	<3	<3
8	7,76 ±0,01	6,95 ±0,04	7,72 ±0,02	6,54 ±0,08	6,13 ±0,16	4	<3	<3
9	8,14 ±0,08	7,52 ±0,06	7,40 ±0,04	6,51 ±0,04	<1	9	<3	<3
10	8,11 ±0,02	7,70 ±0,04	7,83 ±0,02	5,75 ±0,12	<1	9	<3	<3
11	7,23 ±0,08	7,34 ±0,01	5,76 ±0,05	3,78 ±0,08	<1	23	4	4
12	7,85 ±0,07	7,76 ±0,07	6,16 ±0,01	4,20 ±0,02	<1	23	<3	<3
13	7,76 ±0,13	7,64 ±0,05	7,33 ±0,02	4,12 ±0,03	5,48 ±0,01	23	4	4
14	8,33 ±0,02	6,97 ±0,03	7,59 ±0,04	5,71 ±0,06	<1	240	23	23
15	7,12 ±0,03	6,87 ±0,01	6,33 ±0,05	2,39 ±0,12	<1	23	<3	<3
16	6,89 ±0,02	5,99 ±0,02	6,81 ±0,09	3,27 ±0,27	<1	9	<3	<3
17	7,16 ±0,01	6,06 ±0,03	7,22 ±0,04	4,71 ±0,12	<1	<3	<3	<3
18	6,13 ±0,12	4,24 ±0,34	6,35 ±0,10	4,19 ±0,06	<1	<3	<3	<3
19	6,16 ±0,06	5,96 ±0,10	5,81 ±0,01	4,24 ±0,09	<1	<3	<3	<3
20	8,22 ±0,01	8,02 ±0,06	5,00 ±0,08	3,66 ±0,26	<1	<3	<3	<3
21	8,04 ±0,09	7,87 ±0,03	5,09 ±0,03	5,92 ±0,07	<1	9	9	9
22	8,01 ±0,01	7,73 ±0,07	7,40 ±0,07	5,56 ±0,12	<1	<3	<3	<3
23	7,66 ±0,01	7,47 ±0,01	5,90 ±0,02	5,25 ±0,02	<1	23	4	4
24	8,07 ±0,12	7,60 ±0,17	5,67 ±0,01	4,89 ±0,01	<1	4	4	4
25	6,74 ±0,07	5,84 ±0,05	5,48 ±0,12	5,86 ±0,09	<1	<3	<3	<3
26	7,58 ±0,08	4,00 ±0,01	7,22 ±0,03	5,42 ±0,05	<1	<3	<3	<3
27	7,65 ±0,03	7,46 ±0,02	6,33 ±0,04	5,21 ±0,06	<1	23	23	23
28	8,41 ±0,02	7,98 ±0,09	7,05 ±0,04	4,94 ±0,07	<1	<3	<3	<3
29	8,34 ±0,17	7,91 ±0,05	7,23 ±0,03	5,43 ±0,18	5,72 ±0,17	≥2400	≥2400	≥2400
30	6,45 ±0,08	6,49 ±0,14	6,37 ±0,09	3,70 ±0,12	4,83 ±0,18	4	4	4
31	7,77 ±0,01	6,17 ±0,02	4,94 ±0,03	2,15 ±0,21	<1	<3	<3	<3
32	7,87 ±0,03	7,28 ±0,04	4,78 ±0,06	3,01 ±0,23	<1	<3	4	4
33	5,00 ±0,01	5,00 ±0,01	4,45 ±0,21	2,00 ±0,01	<1	<3	<3	<3
34	8,34 ±0,11	8,35 ±0,04	7,16 ±0,02	4,93 ±0,04	3,69 ±0,12	43	23	23
35	5,00 ±0,01	6,70 ±0,02	4,06 ±0,03	2,00 ±0,01	<1	4	<3	<3
36	7,90 ±0,03	8,02 ±0,04	6,07 ±0,04	2,00 ±0,01	4,16 ±0,02	4	<3	<3
37	6,82 ±0,12	6,64 ±0,09	3,00 ±0,01	4,99 ±0,13	<1	<3	<3	<3
38	8,00 ±0,02	7,86 ±0,11	6,15 ±0,01	3,67 ±0,13	4,00 ±0,01	150	20	20
39	6,77 ±0,32	5,46 ±0,04	7,08 ±0,04	3,77 ±0,10	<1	43	<3	<3
40	8,19 ±0,07	7,04 ±0,48	6,95 ±0,03	4,63 ±0,06	<1	240	43	43
41	6,45 ±0,08	6,57 ±0,01	6,47 ±0,05	3,17 ±0,08	3,66 ±0,26	<3	<3	<3
42	6,04 ±0,06	5,50 ±0,28	6,52 ±0,02	2,00 ±0,01	3,00 ±0,01	<3	<3	<3
43	6,69 ±0,11	7,18 ±0,02	6,81 ±0,04	2,00 ±0,01	5,65 ±0,07	<3	<3	<3
44	5,90 ±0,08	5,54 ±0,09	5,70 ±0,02	4,25 ±0,01	1,70 ±0,01	9	<3	<3
45	5,65 ±0,07	4,00 ±0,01	6,16 ±0,01	4,89 ±0,10	<1	23	<3	<3
46	7,22 ±0,02	5,86 ±0,08	5,20 ±0,02	3,77 ±0,05	<1	≥2400	≥2400	≥2400
47	7,52 ±0,06	7,25 ±0,02	7,29 ±0,04	2,00 ±0,01	4,70 ±0,01	240	240	240
48	7,67 ±0,01	7,74 ±0,01	7,15 ±0,04	3,97 ±0,05	<1	4	4	4

Continua

TABELA 5 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE 50 AMOSTRAS DE SALAMES ELABORADOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

	PCA	MRS	MSA	DRBC	BP	VB	EC	Conclusão EC-MUG
<b>49</b>	5,00 ±0,01	4,00 ±0,01	4,00 ±0,01	2,00 ±0,01	<1	<3	<3	<3
<b>50</b>	6,96 ±0,02	6,34 ±0,06	6,96 ±0,08	4,26 ±0,07	4,26 ±0,01	93	93	93

NOTA: Os resultados em PCA (aeróbios mesófilos totais); MRSa (bactérias lácticas); MSA (*Micrococcaceae*); DRBC (bolores e leveduras); BP (*Staphylococcus* coagulase positiva) são expressos em log unidades formadoras de colônias por grama de amostra (log UFC.g<sup>-1</sup>). Os resultados em VB (coliformes totais); EC (coliformes fecais) e EC-MUG (*E. coli*) estão expressos em número mais provável por grama de amostra (NMP.g<sup>-1</sup>). DV (desvio padrão).

#### 4.2.2 Quantidade de Bactérias Lácticas

Na produção de salames é importante a diminuição rápida do pH para evitar o desenvolvimento de microrganismos tanto deteriorantes como patogênicos. O abaixamento do pH é dependente do rápido desenvolvimento das bactérias lácticas. A massa cárnea utilizada para produzir salames por fermentação espontânea deve conter quantidade suficiente tanto de bactérias lácticas como de *Micrococcaceae* para o desenvolvimento adequado da fermentação, obtendo assim um produto seguro e com qualidade (COMI et al., 2005).

A concentração de bactérias lácticas presentes no início da fermentação é bastante variável. Esses microrganismos se multiplicam rapidamente e predominam nos primeiros dias de fermentação, alcançando valores em torno de 8 log UFC.g<sup>-1</sup>. Essa concentração se mantém estável durante a maturação, podendo ocorrer uma diminuição da viabilidade durante essa etapa (SAMELIS et al., 1994; COPPOLA et al., 2000; PAPAMANOLI et al., 2002; MAURIELLO; CASABURI; VILLANI, 2004; GRECO et al., 2005; SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005; COMI et al., 2005).

Nas amostras de salames analisadas, a quantidade de bactérias lácticas teve uma grande variação (Tabela 5). As amostras com a menor concentração tiveram contagens inferiores a 4 log UFC.g<sup>-1</sup>, entretanto na grande maioria das amostras (72%), a presença de bactérias lácticas foi superior a 6 log UFC.g<sup>-1</sup>, sendo que as amostras com as maiores contagens tiveram valores acima de 8 log UFC.g<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos encontrados por AMBROSIADIS et al. (2004), que obtiveram contagens em torno de 4 a 8 log UFC.g<sup>-1</sup>



na caracterização de salames tradicionais da Grécia obtidos por fermentação espontânea.

A concentração final de bactérias lácticas é dependente das condições de produção utilizadas, tais como o binômio temperatura e umidade relativa. MORETTI et al. (2004) verificaram a influência desses fatores utilizando duas condições diferentes de maturação e obtiveram resultados variáveis, com contagens entre 7 e 8 log UFC.g<sup>-1</sup>. Em experimento realizado por SANZ et al. (1997) para avaliar diferentes tempos, temperaturas e umidade relativa durante processamento de salames, a quantidade de bactérias lácticas no produto final foi em torno de 6 log UFC.g<sup>-1</sup>, sendo que durante a fermentação a concentração máxima foi na ordem de 8 log UFC.g<sup>-1</sup>.

Em estudo realizado por SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU (2005) a temperatura de maturação e o teor de gordura afetaram a concentração de bactérias lácticas, sendo que os salames produzidos com 10% de gordura tiveram contagens maiores, seguidos daqueles com 20% e 30% de gordura.

A grande variação na quantidade de bactérias lácticas entre as amostras de salames avaliadas pode ser justificada pelas diferentes condições de produção utilizadas, pois nas pequenas indústrias brasileiras, durante a etapa de fermentação e maturação, os produtos são armazenados em condições ambientais não controladas. Fatores como a variação na quantidade dos componentes principais das formulações (gordura e proteínas), a microbiota inicial da matéria-prima e os temperos adicionados também podem ser a causa dessas diferenças. Outro fator importante que pode interferir no número de bactérias lácticas é o tempo de maturação dos salames fermentados. Pela data de fabricação das amostras coletadas verificou-se que algumas peças tinham sido produzidas a poucos dias, portanto não tiveram um período de fermentação/maturação adequado, enquanto que em outras o período foi maior, pois tinham sido produzidas há mais de 21 dias.

As reações metabólicas ocasionadas pelo crescimento dos microrganismos em salames fermentados, especialmente das bactérias lácticas, são as principais responsáveis pelo desenvolvimento das características finais, peculiares desses produtos. Quantidades elevadas de bactérias lácticas contribuem também com a

segurança e a estabilidade microbiológica dos salames, pela inibição do crescimento de bactérias patogênicas e também da flora microbiana deteriorante. A supressão dos competidores pelas bactérias lácticas ocorre principalmente devido às mudanças nas características do substrato (pH e  $A_w$ ), ocasionado pela produção de ácidos orgânicos. Também algumas espécies de bactérias lácticas produzem substâncias denominadas de bacteriocinas, capazes de inibir o crescimento de algumas espécies de microrganismos (HAMMES; BANTLEON; MIN, 1990; SAMELIS et al., 1994; HUGAS; MONFORT, 1997; HANSEN, 2002; HOLZAPFEL, 2002; PAPAMANOLLI et al., 2003; TERRA, 2003; LEROY; De VUYST, 2004).

#### 4.2.3 Quantidade de *Micrococcaceae*

Os resultados da quantidade de *Micrococcaceae* das amostras de salames fermentados analisadas estão apresentados na Tabela 5. Semelhante ao ocorrido na contagem total de aeróbios mesófilos e/ou facultativos e bactérias lácticas, a concentração de *Micrococcaceae* teve uma grande variação entre as amostras avaliadas. A maioria das amostras teve concentração entre 5 log UFC.g<sup>-1</sup> e 7 log UFC.g<sup>-1</sup>. Fatores como as condições de processamento, concentração inicial de *Micrococcaceae* da massa cárnea, tempo de maturação, quantidade de bactérias lácticas e o pH do produto podem interferir no tamanho final da população de *Micrococcaceae* (SONDERGAARD; STAHNKE, 2001; MAURIELLO; CASABURI; VILLANI, 2004).

Em geral a concentração de *Micrococcaceae* é máxima no final da fermentação (SANZ et al., 1997). Na literatura, os resultados são controversos tanto na etapa de maturação, como na concentração final de *Micrococcaceae* em diferentes tipos de salames. Em estudo realizado por PAPAMANOLI et al. (2002), o número de *Micrococcaceae* no início da fermentação de 3 a 4 log UFC.g<sup>-1</sup> não aumentou durante a maturação ficando abaixo de 2 log UFC.g<sup>-1</sup> no produto final. Em estudos de caracterização de salames fermentados espontaneamente, a concentração inicial de *Micrococcaceae* de 3 a 4 log UFC.g<sup>-1</sup> evoluiu durante a maturação, atingindo em torno

de 6 log UFC.g<sup>-1</sup> no produto final (COPPOLA et al., 2000; MAURIELLO; CASABURI; VILLANI, 2004; COMI et al., 2005).

A temperatura de maturação afeta significativamente a concentração final de *Micrococcaceae*. Durante o período de fermentação, salames produzidos em temperatura de 24-26°C, a concentração de *Micrococcaceae* foi de aproximadamente 7 log UFC.g<sup>-1</sup>, já a 22-24°C a contagem ficou abaixo de 6 log UFC.g<sup>-1</sup>. Em ambas condições ocorreu uma diminuição de *Micrococcaceae* na sequência do período de maturação (SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005).

O baixo número de *Micrococcaceae* durante o processamento de salames fermentados ou a diminuição da concentração no período de maturação pode ser devido à inibição causada pela diminuição acentuada do pH (SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005), ocasionado pelo desenvolvimento das bactérias lácticas. SANZ et al. (1997) verificaram que a maior contagem de *Micrococcaceae* ocorreu em salames com menor quantidade final de bactérias lácticas e conseqüentemente valores de pH mais elevados.

#### 4.2.4 Quantidade de Bolores e Leveduras

Algumas das amostras de salames analisadas apresentaram contagens de bolores e leveduras inferiores a 2 log UFC.g<sup>-1</sup>, já as que apresentaram maiores quantidades ficaram acima de 6 log UFC.g<sup>-1</sup> de amostra (Tabela 5). Em todas as amostras verificou-se a predominância do crescimento de leveduras em relação aos bolores, estes últimos se desenvolvem principalmente na superfície dos salames, sendo uma conseqüência natural do processo tecnológico de fabricação (SUNESSEN; STAHNKE, 2003).

Vários trabalhos enfocam a utilização de bolores e leveduras ou suas enzimas na produção de salames, as reações metabólicas resultantes podem contribuir com a formação do aroma e conseqüentemente da qualidade sensorial final dos salames. (ZALACAIN et al., 1995; ZALACAIN et al., 1996; ZAPELENA; ASTIASARÁN; BELLO; 1999; CASTRO; LUCHESE; MARTINS, 2000; BRUNA et al., 2003;

SUNESSEN; STAHNKE 2003; DURÁ; FLORES; TOLDRÁ, 2004; FLORES et al., 2004).

A quantidade de bolores e leveduras das amostras de salames analisadas neste trabalho é similar às encontradas por AMBROSIADIS et al. (2004). Em estudo realizado por COMI et al. (2005), a quantidade máxima verificada foi em torno de 3 log UFC.g<sup>-1</sup>, sendo que em alguns casos não foi detectada a presença de bolores e leveduras nas amostras. BOZKURT; ERKMEN (2002) realizaram estudos para avaliar os efeitos da adição de culturas *starter* e aditivos em salames e verificaram que ocorreu um aumento no número de bolores e leveduras durante os primeiros dias de fermentação, atingindo concentrações em torno de 4 log UFC.g<sup>-1</sup> nos tratamentos sem a adição de aditivos. Esses números diminuíram durante as etapas seguintes de maturação e armazenamento. Em outros trabalhos foram encontradas concentrações de bolores e leveduras em torno de 6 log UFC.g<sup>-1</sup> no produto final (SAMELIS et al., 1994; COPPOLA et al., 2000).

LEBERT et al. (2007) verificaram que em salames elaborados por pequenas indústrias da França a quantidade média de bolores e leveduras na massa cárnea foi acima de 4 log UFC.g<sup>-1</sup>. A população média desses microrganismos durante a fermentação aumentou 1 log, sendo que no produto final a quantidade ficou em torno de 5,4 log UFC.g<sup>-1</sup>.

#### 4.2.5 Quantidade de Coliformes Totais, Fecais e *Escherichia coli*

É indispensável que a massa cárnea utilizada para a produção de salames tenha boa qualidade microbiológica, para obter um produto final com contagens baixas de bactérias indicadoras de condições higiênicas. Normalmente, a quantidade de *Enterobacteriaceae* diminui à medida que o processo de maturação ocorre (SAMELIS et al., 1998; MORETTI et al., 2004), porém em alguns casos ocorre um aumento no número (COMI et al., 2005).

Em relação à contagem de coliformes a 45°C, 31 amostras apresentaram valores <3 NMP.g<sup>-1</sup>, 17 amostras apresentaram valores entre 3 e 240 NMP.g<sup>-1</sup> e 2

amostras apresentaram valores superiores a 2.400 NMP.g<sup>-1</sup> (Tabela 5). A resolução RDC nº 12, de 2 janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabelece o máximo de 10<sup>3</sup> NMP.g<sup>-1</sup> de coliformes a 45°C para salames (BRASIL, 2001), portanto duas amostras foram classificadas como impróprias para o consumo humano. Contagens elevadas desses microrganismos indicam processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento, sendo as causas mais freqüentes aquelas provenientes da matéria-prima, equipamento s ujo ou manipulação sem cuidados de higiene (TILDEN et al., 1996).

A presença de *E. coli* foi confirmada em 38% das amostras de salames, sendo que não foi possível fazer uma correlação entre a presença desses microrganismos e os valores de Aw e de pH dos salames. Concentrações superiores foram encontradas em outros trabalhos, onde acima de 80% das amostras estavam contaminadas por *E. coli* (MAGNANI et al., 2000; VIOTT; STOLBERG; PELISSER, 2006). O significado da presença de *E. coli* em um alimento deve ser avaliado sob dois ângulos. Inicialmente por ser um coliforme fecal verdadeiro, indica que o alimento teve uma contaminação de origem fecal, o outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem (INCZE, 1998; FRANCO; LANDGRAF, 2003; MOORE, 2004).

#### 4.2.6 *Staphylococcus* Coagulase Positiva

Os resultados da quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva, das 50 amostras de salame analisadas, estão apresentadas na Tabela 5. A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva foi confirmada em 15 amostras (30%), sendo que 11 apresentaram quantidades acima do máximo tolerado pela legislação vigente (3,7 log UFC.g<sup>-1</sup>), portanto em condições sanitárias impróprias para o consumo (BRASIL, 2001). Cabe ressaltar que para a grande maioria das amostras (73%) com presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, o valor do pH dos salames foi superior a 5,8. Para o parâmetro Aw, exceto para uma amostra, os valores foram superiores a 0,86, atividade de água mínima para a multiplicação do *Staphylococcus aureus* (FRANCO;

LANDGRAF, 2007). Isso pode ter contribuído para o desenvolvimento desses microrganismos.

Em estudo realizado por LOBO et al., (2001) a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em salames foi observada em quantidade de 6 log UFC.g<sup>-1</sup> ou superior, em 45% das amostras analisadas.

Mesmo nas amostras com quantidade inferior ao tolerado, não significa a ausência de enterotoxinas, pois inicialmente esses microrganismos poderiam estar presentes em número suficiente para produzir toxinas e sua população diminuiu durante a etapa de fermentação (MOORE, 2004).

#### 4.2.7 *Salmonella* spp.

Todas as amostras de salame analisadas apresentaram ausência de *Salmonella* em 25 gramas, satisfazendo assim a legislação em vigor (BRASIL, 2001). Em estudos realizados por LOBO et al. (2001) e HOFFMANN et al. (1997) para avaliar a qualidade de salames, a presença de *Salmonella* foi verificada em 5% e 13,3% das amostras analisadas, respectivamente.

#### 4.2.8 *Listeria monocytogenes*

Os resultados obtidos nos testes realizados com as colônias típicas de *Listeria*, isoladas de amostras de salames, estão apresentadas no Quadro 4. A *Listeria* tem dificuldade de crescer em produtos cárneos curados devido à presença da microflora típica, juntamente com as características físico-químicas desses produtos. Dessa forma, o risco à saúde, associado a ocorrência de *L. monocytogenes* em salames fermentados processados de forma adequada, parece ser baixo (BARBUTI; PAROLARI, 2002).

QUADRO 4 – CARACTERÍSTICA DAS CEPAS TÍPICAS DE *Listeria* ISOLADAS DE DIFERENTES AMOSTRAS DE SALAMES

CARACTERÍSTICAS	CEPAS									
	Lm*	1	2	3	10	11	12	13	19	20
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidade	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSI	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
H <sub>2</sub> S (TSI)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólise	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Manitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Camp-teste <i>S.aureus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Camp-teste <i>R. equii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CARACTERÍSTICAS	CEPAS									
	Lm*	23	26	29	38	39	43	44	46	47
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidade	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSI	A/A	A/A	A/A	A/K	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
H <sub>2</sub> S (TSI)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólise	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Maltose	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilose	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Camp-teste <i>S.aureus</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Camp-teste <i>R. equii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

\* Características da espécie *Listeria monocytogenes* (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007)

Pela análise dos resultados dos testes realizados com as colônias suspeitas de bactérias do gênero *Listeria*, verificou-se que as cepas 43, 44, 46 e 47 (números referentes às amostras de salames das quais foram isoladas) apresentaram reações típicas de *Listeria monocytogenes* de acordo com as características descritas para essa

espécie (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007). Dessa forma, em 8% das amostras de salames avaliadas neste trabalho foi verificada a presença de *L. monocytogenes*.

GANDHI; CHIKINDAS (2007) citam a ocorrência de vários casos de listeriose vinculada a diferentes tipos de alimentos, bem como o isolamento de *L. monocytogenes* em uma grande variedade de matérias-primas e de alimentos processados, dentre os quais, leite e seus derivados, vários tipos de carnes e produtos derivados, tais como os salames.

A utilização de culturas protetoras pode contribuir na redução da ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos fermentados. Em salames elaborados com cultura *starter* comercial foi verificado a ausência de *Listeria* no final do processo de maturação. Entretanto, nos salames elaborados com culturas protetoras (*Lactobacillus rhamnosus* LC-705, *L. rhamnosus* E-97800 e *L. plantarum*) foi observado uma ação adicional contra a *Listeria*, sendo que a ausência de *Listeria* foi observada já no início do processo de maturação (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas têm se mostrado uma alternativa para aumentar a qualidade sanitária dos alimentos, demonstrando potencial para substituir conservantes químicos. A utilização de bacteriocinas produzidas por *Pediococcus acidilactici* foi eficiente no controle de *L. monocytogenes* em carnes, porém os efeitos sobre o crescimento do *Clostridium perfringens* somente foi observado no tratamento que recebeu uma alta quantidade de bacteriocina (NIETO-LOZANO et al., 2006).

SIRIKEN et al., (2006) verificaram em salames fermentados e posteriormente pasteurizados, típicos da Turquia (*Soudjouck*), a presença de *L. monocytogenes* em 7% das amostras. Os autores citam estudos onde a ocorrência de *L. monocytogenes* em diferentes tipos de salames de vários países varia de 0% a 21%. FRANCO; LANDGRAF (1996) relatam vários surtos de listeriose relacionados ao consumo de diversos alimentos, sendo que em alguns casos o índice de mortalidade atingiu 29%.

LEBERT et al. (2007), analisando a diversidade de microrganismos de salames fermentados, produzidos por nove pequenas indústrias tradicionais da França, verificaram a presença de *L. monocytogenes* em amostras de salames de três unidades.



Em estudo realizado para verificar a microbiota presente nas instalações de 54 pequenas indústrias produtoras de salames fermentados, em diversos países da Europa, a presença de *L. monocytogenes* foi verificada em 6,7% das unidades (TALON et al., 2007). Esses microrganismos têm a capacidade de produzir biofilmes que facilitam a aderência e protegem as células durante os processos de higienização (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

#### 4.2.8 Avaliação Geral da Qualidade Microbiológica das Amostras de Salames

Em relação às características microbiológicas analisadas, 24% das amostras estão em desacordo com as Normas Legais vigentes no Brasil, pois apresentaram quantidades superiores do máximo tolerado para coliformes a 45°C ou *Staphylococcus* coagulase positiva. A reprovação indica a necessidade da implantação de programas que atentem para a melhoria da qualidade sanitária nas pequenas indústrias produtoras de salames, bem como uma maior fiscalização pelos órgãos competentes, visando eliminar riscos à saúde dos consumidores.

Os salames produzidos por fermentação espontânea, fabricados por pequenas indústrias do setor de carnes do Brasil, apresentam uma população de microrganismos com importância tecnológica (bactérias lácticas, *Micrococcaceae*, bolores e leveduras) semelhante ao de outros tipos de salames fermentados já descritos na literatura.

O uso de condições ambientais controladas de produção, bem como a padronização do tempo de maturação, pode contribuir para a obtenção de salames com menor variação nas características e melhor qualidade final, reduzindo a possibilidade da ocorrência de toxinfecções associadas a esses produtos.

#### 4.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DAS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SALAMES ELABORADOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

As características metabólicas dos microrganismos, além de serem empregadas para classificá-los, são também utilizadas para selecionar cepas com características tecnológicas adequadas, para a utilização como culturas *starter*.

As culturas *starter* devem apresentar características que contribuem com a qualidade final dos alimentos fermentados. Durante a seleção de estirpes para a utilização como *starter*, leva-se em conta a presença de características microbianas que podem alterar de forma negativa as características do alimento fermentado, tais como a textura, a viscosidade e as características sensoriais do produto (HANSEN, 2002).

##### 4.3.1 Morfologia e Coloração de Gram

Um total de 50 colônias de bactérias foi isolado a partir de dez amostras de salames. Dos isolados 49 cepas apresentaram a forma de bacilo e uma cepa a forma de coco. No teste de coloração de Gram todos os isolados desenvolveram reação positiva. Estas características são comuns ao grupo das bactérias lácticas (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). Foram observadas variações no tamanho dos bacilos entre as cepas avaliadas, isso indica a presença de várias espécies ou linhagens diferentes de *Lactobacillus* nas amostras de salames obtidos por fermentação espontânea.

##### 4.3.2 Atividade da Catalase e da Oxidase

A catalase é uma enzima capaz de degradar o peróxido de hidrogênio, característica muito importante em culturas *starter* utilizadas na produção de salames, pois o peróxido de hidrogênio pode participar de reações que provocam a descoloração do produto. Entretanto, a produção catalase é mais comum em *Micrococcaceae* (BUCKENHÜSKES, 1993), sendo que os lactobacilos apresentam reação negativa para catalase, porém algumas espécies como *L. mali* pode apresentar pseudo-catalase

(ROISSART; LUQUET, 1994). Para todas as cepas isoladas, os testes para a atividade da catalase e da oxidase foram negativos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores (COPOLLA et al., 2000; PAPAMANOLI et al., 2003).

#### 4.3.3 Capacidade de Produzir Gás (CO<sub>2</sub>)

A produção de gás pelos microrganismos em alguns produtos fermentados é desejável, como a formação de “olhos” em determinados tipos de queijos (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; GIRAFFA, 2004; HANSEN, 2002), porém essa característica é negativa para a produção de salames. Das 50 cepas de lactobacilos testadas neste trabalho, somente uma (2%) produziu gás, sendo obrigatoriamente classificada como lactobacilo heterofermentativo (GRECO et al., 2005). As demais cepas foram negativas para esta característica.

A produção de elevada quantidade de gás por bactérias lácticas heterofermentativas pode ocasionar alterações sensoriais do produto cárneo (TERRA, 1998) e levar a formação de orifícios de diferentes tamanhos no interior dos salames (BUCKENHÜSKES, 1993). A formação de gás durante a etapa de fermentação dos salames também pode ocasionar o rompimento da tripa com conseqüente perda do produto.

GRECO et al. (2005) realizaram estudo para identificar bactérias lácticas isoladas durante a maturação de salames produzidos por fermentação espontânea. Os autores verificaram em 5,5% das cepas de lactobacilos a produção de gás a partir de glicose. Já em estudo realizado por HUGAS et al. (1993), todos as cepas avaliadas foram caracterizadas como lactobacilos homofermentadores, ou seja, não produtores de gás a partir de glicose. Resultados semelhantes aos anteriores também foram obtidos por DROSINOS et al. (2005) e PAPAMANOLI et al., (2003), na caracterização da microbiota de salame fermentado típico da Grécia.

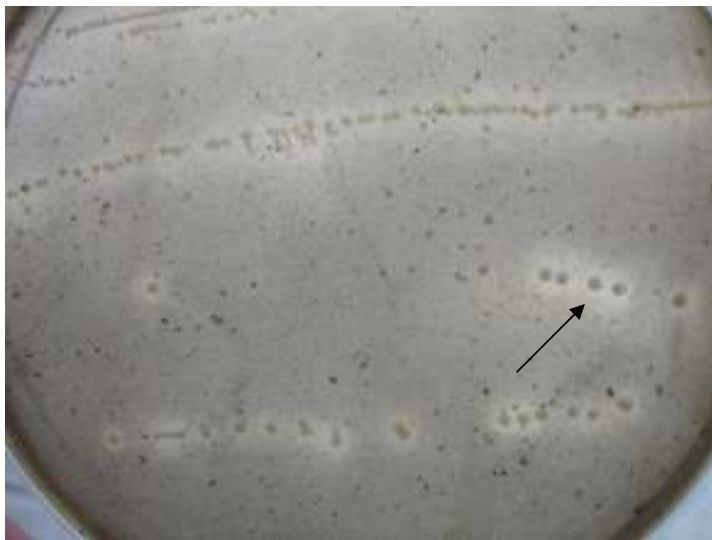
Resultados diferentes aos anteriores e aos obtidos nesta pesquisa foram encontrados em um estudo realizado para caracterizar a população microbiana de salame da Grécia obtido por fermentação espontânea. Neste caso, 61% das cepas de

bactérias lácticas isoladas dos produtos foram classificadas como lactobacilos homofermentadores (SAMELIS et al., 1994).

#### 4.3.4 Produção de Peróxido de Hidrogênio

Das cepas avaliadas neste estudo, em duas foi observada a formação de halo evidente, em 23 o halo foi discreto e em 25 não houve a formação de halo ao redor das colônias (Figura 8). A formação de halo no meio de cultura ao redor das colônias é devido a produção de  $H_2O_2$  pelos microrganismos (Figura 8). Assim, 50% das cepas de lactobacilos avaliadas produziram peróxido de hidrogênio.

FIGURA 8 – FORMAÇÃO DE HALO AO REDOR DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DEVIDO À PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO



FONTE: O AUTOR.

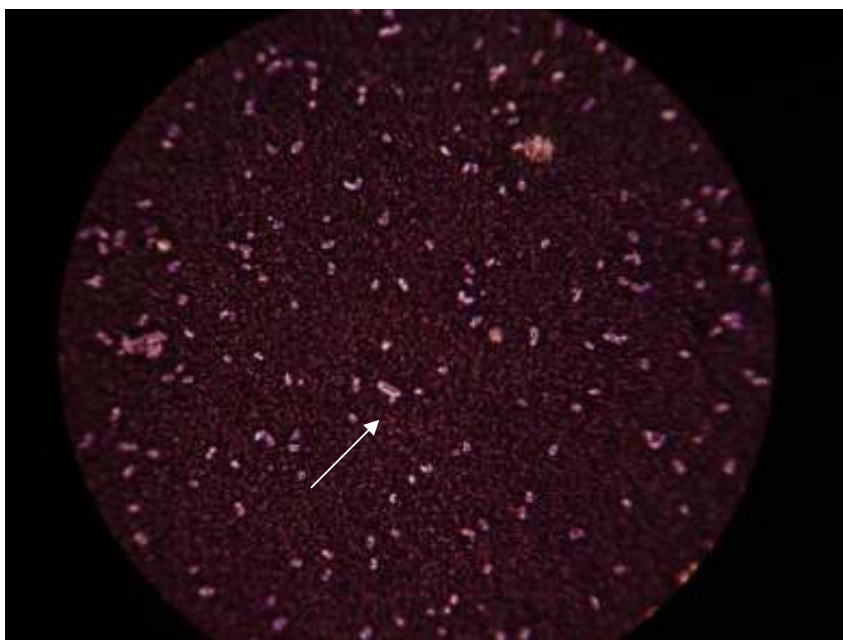
Em estudo realizado por PAPAMANOLI et al., (2003) para caracterizar cepas de bactérias lácticas isoladas de salames fermentados da Grécia, os autores verificaram que 84% das cepas de *Lactobacillus sakei*, 58% das cepas de *Lactobacillus curvatus* e 100% das cepas de *Lactobacillus plantarum* foram produtoras de  $H_2O_2$ . Uma grande variação na capacidade de produzir peróxido de hidrogênio entre as espécies do gênero *Lactobacillus* também foi observada por SAMELIS; MAUROGENAKIS; METAXOPOULOS (1994).

A grande maioria dos lactobacilos é capaz de formar peróxido de hidrogênio pela oxidação do lactato. Em alguns produtos fermentados, a produção de  $H_2O_2$  é benéfica, pois pode dificultar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (BUCKENHÜSKES, 1993). Em salames fermentados, a produção de  $H_2O_2$  por bactérias lácticas pode provocar alterações no *flavour* e também na coloração, pois reage com os pigmentos da carne (PAPAMANOLI et al., 2003). Para culturas *starter* de salames, o ideal é selecionar cepas de bactérias lácticas que não produzam  $H_2O_2$  ou que produzam em pequena quantidade (BUCKENHÜSKES, 1993).

#### 4.3.5 Produção de Dextrana

Das cepas avaliadas neste trabalho, 10% sintetizaram cápsula evidente, 56% produziram uma cápsula delgada e 34% foram incapazes de sintetizar cápsula a partir de sacarose. Na Figura 9 pode ser visualizada a presença de cápsulas em células da cepa de *Lactobacillus plantarum* 503.

FIGURA 9 – PRESENÇA DE CÁPSULA AO REDOR DE CÉLULAS DE *Lactobacillus plantarum* 503.



FONTE: O AUTOR (ampliação de 1.000 vezes)

Várias espécies de microrganismos produzem uma cápsula ao redor da célula que possui diversas funções e composição variada, sendo que algumas são constituídas por polissacarídeos, tais como dextrana (PELCZAR Jr.; CHAN; KRIEG, 1996). A capacidade de produzir exopolissacarídeos que alguns microrganismos possuem pode ser positiva para alguns alimentos fermentados, por exemplo o iogurte, pois pode contribuir para a melhoria da textura final do produto (LEROY; DE VUYST, 2004). Porém, em salames fermentados, a produção de cápsulas de polissacarídeos pelos microrganismos responsáveis pela fermentação da massa cárnea pode contribuir de forma negativa durante o processamento, principalmente durante o fatiamento. A cápsula pode-se aderir aos equipamentos e ser fonte de contaminação para outros produtos (BUCKENHÜSKES, 1993). Dessa forma, ao selecionar estirpes para serem utilizadas como culturas *starter* na indústria cárnea, quando possível, deve ser levada em conta essa característica.

Os resultados obtidos neste trabalho são contraditórios aos encontrados por DROSINOS et al. (2005), em estudo realizado para caracterizar a microbiota de salames tradicionais da Grécia. Os autores verificaram que a grande maioria (96%) das colônias de bactérias lácticas isoladas não produziu dextrana a partir de sacarose. Esses resultados também são contraditórios aos encontrados em outros estudos com o mesmo objetivo, onde a produção de dextrana a partir de sacarose foi verificada em quantidades inferiores a 30% das cepas avaliadas (SAMELIS; MAUROGENAKIS; METAXOPOULOS, 1994; SAMELIS et al., 1998; SANTOS et al., 1998).

#### 4.3.6 Capacidade de Acidificação

No teste realizado para avaliar a capacidade de acidificação das cepas de bactérias lácticas isoladas das amostras de salames, verificou-se uma grande queda no valor do pH. Após 24 horas de fermentação em caldo MRS, o valor final do pH variou de 3,56 a 4,52. Para seis cepas (12%), o valor do pH foi superior a 4,0, já as demais cepas isoladas tiveram uma melhor capacidade de acidificação, onde o pH final do meio para a grande maioria das cepas ficou abaixo de 3,8.

Uma rápida capacidade de acidificação é característica importante para selecionar culturas *starter* para a utilização na fabricação de salames, pois ocasionam uma ligeira queda do pH da massa cárnea, dando estabilidade ao produto (BUCKENHÜSKES, 1993). Sendo assim, as cepas avaliadas neste estudo possuem característica adequada para a utilização como *starter* na produção de salames, em relação à capacidade de acidificação.

HUGAS et al. (1993) realizaram estudo para caracterizar lactobacilos isolados de salames fermentados. Os autores verificaram que 68% das cepas de *L. plantarum* reduziram o pH do caldo MRS após 24 h para valores inferiores a 3,9. As outras espécies de lactobacilos avaliadas não foram capazes de reduzir o pH do caldo a esse limite.

Em estudo realizado para verificar a produção de ácido láctico por diferentes cepas de bactérias lácticas, o pH do caldo MRS ficou entre 4,1 e 4,3, diferenças que não afetaram a qualidade sensorial dos salames produzidos (ERKKILÄ et al., 2001).

A capacidade de acidificação de bactérias lácticas isoladas durante a maturação de salames da ilha de Sardenha foi moderada para 95% das cepas avaliadas. Os valores de pH variaram de 3,85 a 5,36, sendo que a média foi de 4,62 (GRECO et al., 2005).

Em estudo realizado para caracterizar bactérias lácticas isoladas de salame da Grécia produzidos por fermentação espontânea foi verificado que o pH final do caldo ficou entre 3,6 e 4,3 para os lactobacilos homofermentativos. Já para os lactobacilos heterofermentativos os valores de pH foram superiores, estando entre 4,3 e 4,5 (SAMELIS; MAUROGENAKIS; METAXOPOULOS, 1994).

#### 4.3.7 Capacidade de Crescimento em Diferentes Concentrações de Cloreto de Sódio e Nitrito de Sódio

O cloreto de sódio, juntamente com o nitrito de sódio, são ingredientes utilizados na produção de salames. Assim, as culturas *starter* utilizadas para a produção de salames devem ser resistentes às concentrações utilizadas nas

formulações. Neste teste, as diferentes concentrações de cloreto de sódio (5% e 8%) e a associação de cloreto de sódio (3%) com nitrito de sódio (200 ppm) não foram limitantes ao crescimento das cepas de lactobacilos avaliadas, exceto para a cepa 204 que teve seu crescimento inibido pela presença do  $\text{NaNO}_2$ . Nas formulações de salames geralmente são utilizados 3% de  $\text{NaCl}$  e 200 ppm de  $\text{NaNO}_2$  para impedir o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e garantir a inocuidade do produto, além de contribuir com a formação de características sensoriais.

Em estudo realizado por MACEDO et al. (2005), as diferentes concentrações de  $\text{NaCl}$  (0% a 3%) e de  $\text{NaNO}_2$  (0 a 200 ppm), bem como o meio contendo  $\text{NaCl}$  (3%) e  $\text{NaNO}_2$  (200 ppm) não interferiu no crescimento das culturas de *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e *L. casei*. A resistência a diferentes concentrações de nitrito (150-750 ppm) também foi observada por HUGAS et al. (1993).

A tolerância das diferentes espécies de lactobacilos em relação à concentração de  $\text{NaCl}$  é bastante variável, isto ocorre também entre as cepas de uma mesma espécie. A espécie *L. plantarum* possui maior tolerância dentro do gênero, tendo crescimento mesmo em concentrações mais elevadas (10%) de  $\text{NaCl}$  (HUGAS et al., 1993; PAPAMANOLI et al., 2003). Porém os resultados encontrados são contraditórios. Em estudo realizado por SAMELIS et al. (1998), todas as cepas de *L. sake* e *L. curvatus* cresceram na presença de 8% de  $\text{NaCl}$ . Já em outras pesquisas, o crescimento destas espécies foi parcial (PAPAMANOLI et al., 2003; DROSINOS et al., 2005).

#### 4.3.8 Capacidade de Crescimento em Diferentes Valores de pH

Pela análise dos resultados obtidos no ensaio realizado para avaliar a capacidade de crescimento em condições ácidas foram observadas diferenças entre as cepas testadas. O pH interferiu no crescimento das culturas, sendo que o meio com pH 3 foi impróprio para a multiplicação celular para 5 cepas, as demais tiveram crescimento, porém inferior quando comparadas aos meios com pH 4 e 5.

Esses resultados diferem dos encontrados por PAPAMANOLI et al. (2003), onde não houve crescimento em meio com pH 3,0 para todas as cepas testadas. A



capacidade de crescimento mesmo nos meios com valores de pH 4,0 e 5,0 não foi total, exceto para as cepas de *L. plantarum*.

A capacidade de multiplicação em diferentes valores de pH, além de ser utilizada como uma característica tecnológica, para a seleção de culturas *starter*, também é utilizada como ferramenta para a caracterização das espécies (SHAW; HARDING, 1984; SAMELIS; MAUROGENAKIS; METAXOPOULOS, 1994).

A capacidade de se multiplicar em meio ácido é condição fundamental para que a cultura tenha condições de proporcionar uma boa acidificação na massa cárnea durante o processamento de salames (BUCKENHÜSKES, 1993). A sobrevivência em condições ácidas também é característica fundamental na seleção de cepas com ação probiótica (PENNACCHIA et al., 2004).

#### 4.3.9 Capacidade de Crescimento em Diferentes Temperaturas

Pela análise dos resultados do ensaio realizado para avaliar a capacidade de multiplicação em diferentes temperaturas, verificou-se que das cepas testadas todas foram capazes de crescer em temperaturas de 4, 15, e 37°C, porém, quando as culturas foram incubadas a 45°C, sete (14%) cepas não foram capazes de se multiplicar.

Entre as espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, a capacidade de crescimento em diferentes temperaturas é bastante variável. Estudos publicados reportam dados conflitantes quanto ao crescimento de várias espécies de lactobacilos em temperaturas de 4 e 45°C (DROSINOS et al., 2005; PAPAMANOLI et al., 2003).

#### 4.3.10 Potencial Probiótico

A estabilidade dos alimentos fermentados, bem como sua qualidade, podem ser obtidas pela adição de culturas *starter* durante o processamento, que também podem proporcionar efeitos benéficos à saúde dos consumidores (LÜCKE, 2000; HANSEN, 2002; TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2002; LEROY; De VUYST, 2004). Entretanto, para exercer ação probiótica no trato gastrintestinal,

como condição básica, os microrganismos devem ser capazes de sobreviver às condições limitantes existentes no processo de digestão dos alimentos. As condições ácidas do estômago, bem como a presença de sais biliares no início do intestino delgado são os principais obstáculos à sobrevivência dos microrganismos (PENNACCHIA et al., 2004; PAPAMANOLI et al., 2003).

#### 4.3.10.1 Resistência à acidez

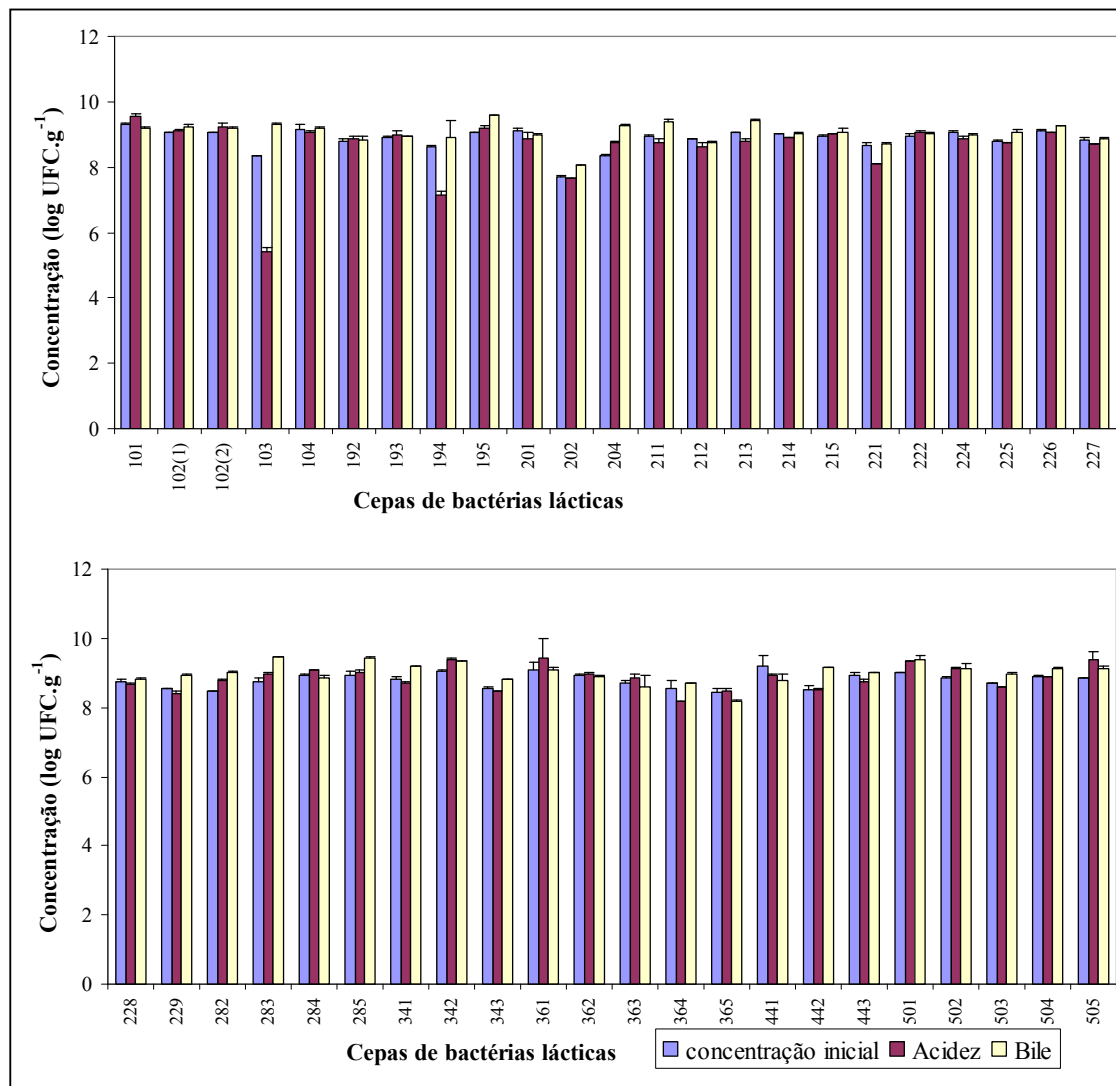
A sobrevivência das bactérias quando em contato com o suco gástrico depende da habilidade desses microrganismos em tolerar valores baixos de pH do meio. Pela análise dos resultados obtidos nos testes de exposição a condições ácidas (Figura 10), verificou-se que a maioria das cepas de lactobacilos avaliadas foi tolerante quando mantida em pH 3,0. Após três horas de incubação em condições ácidas, a população microbiana permaneceu em concentração próxima a inicial. Entretanto, 21 cepas tiveram uma diminuição em sua população, sendo que a cepa 103 apresentou a maior sensibilidade às condições ácidas do teste, reduzindo em quase três ciclos logarítmicos sua população em relação à concentração inicial. Cabe ressaltar que, exceto para as cepas 103 e 194, a diminuição da população verificada após a exposição às condições ácidas não foi limitante, sendo que a redução foi inferior a 0,3 log UFC.ml<sup>-1</sup> em relação a população inicial.

Por outro lado, das cepas avaliadas, 23 (51%) aumentaram sua população depois de mantidas em pH 3,0 por 3 horas a 37°C. A cepa 342 teve o maior aumento em sua população, em torno de 1,3 log UFC.ml<sup>-1</sup>, quando comparada com a população inicial. Os resultados obtidos neste teste são semelhantes aos encontrados por outros autores (PENNACCHIA et al., 2004; ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000).

A capacidade de sobreviver em pH 3,0 durante um período aproximado de três horas é uma característica fundamental para que um microrganismo tenha potencial probiótico, pois é esse o pH estomacal após a ingestão do alimento e o tempo médio de permanência do alimento nestas condições (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000). O isolamento de espécies da microbiota nativa de salames permite selecionar culturas *starter*

probióticas adaptadas às condições de produção de salames e com capacidade de dominar a microflora nativa dos produtos cárneos, produzindo alimentos de boa qualidade e seguros à saúde do consumidor.

FIGURA 10 – RESULTADOS DOS TESTES DE VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE 45 CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM RELAÇÃO À RESISTÊNCIA À ACIDEZ E À TOLERÂNCIA AOS SAIS BILIARES



Nota: Acidez (37°C/3 h em PBS com pH 3,0); Bile (37°C/4 h em caldo MRS com 0,3% de sais biliares).

#### 4.3.10.2 Tolerância à bile

Os sais biliares são lançados no início do intestino delgado após a ingestão de alimentos gordurosos e funcionam como um detergente, emulsificando as gorduras e facilitando a digestão. Entretanto, a membrana celular dos microrganismos é constituída também por lipídios e ácidos graxos, assim sendo, os sais biliares são críticos para muitas espécies (PENNACCHIA et al., 2004). Cepas de *Lactobacillus* foram consideradas tolerantes aos sais biliares quando uma população de  $6-7 \log \text{ UFC.ml}^{-1}$  foi reduzido para  $\geq 5 \log \text{ UFC.ml}^{-1}$  após quatro horas de exposição (PAPAMANOLI et al., 2003).

Avaliando os resultados obtidos no teste de tolerância aos sais biliares, verificou-se que as cepas de lactobacilos isoladas de salames não foram afetadas de forma limitante pela presença de 0,3% de sais biliares. Após quatro horas de exposição aos sais biliares, a população microbiana da maioria das cepas avaliadas se manteve próxima à concentração inicial, conforme pode ser observado nos dados da Figura 10.

A cepa com maior sensibilidade aos sais biliares (441) apresentou redução de sua população em torno de 0,4 ciclos logarítmicos. Por outro lado, a grande maioria das cepas avaliadas foi capaz de se multiplicar na presença dos sais biliares, aumentando a população final. Esse aumento na população microbiana também foi observado por MACEDO (2005) testando uma cepa de *Lactobacillus paracasei* utilizada no processamento de um produto cárneo fermentado probiótico.

Os resultados obtidos neste teste são semelhantes aos encontrados por outros pesquisadores, onde foram selecionadas cepas de *Lactobacillus* isolados de salames fabricados com adição de *starter* comercial ou produzidos por fermentação espontânea (PAPAMANOLI et al., 2003; ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; PENNACCHIA et al., 2004).

Sendo assim, em relação à resistência aos sais biliares, a grande maioria das cepas avaliadas nesta pesquisa possuem essa característica probiótica, pois sobrevivem ou se multiplicam na presença de 0,3% de sais biliares, concentração média de bile encontrada no trato gastrintestinal humano. Essa resistência está relacionada com a

capacidade que certas espécies de microrganismos possuem em reduzir o efeito desse detergente, por produzirem enzimas capazes de hidrolisar os sais biliares (ERKKILÄ, PETÄJÄ, 2000).

Cabe ressaltar que além da capacidade de sobreviver durante a passagem pelo trato gastrointestinal, a adesão nas células do epitélio intestinal para a colonização e a capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos são importantes características para a seleção de cepas com potencial probiótico (PENNACCHIA; VAUGHAN; VILLANI, 2006).

BUJALANCE et al. (2007) verificaram a ação probiótica de *L. plantarum* pela estimulação das respostas linfocitárias em camundongos normais e imunocomprometidos. Porém, a cultura foi incapaz de colonizar o trato gastrointestinal de forma persistente. Dessa forma, a colonização persistente não é um requisito necessário para exercer efeitos imunomoduladores, isto pode ser alcançado por cepas probióticas transientes capazes de sobreviver no trato gastrointestinal, desde que administradas de forma continuada e por um tempo suficiente. NGUYEN; KANG; LEE (2007) verificaram a atividade probiótica da cepa de *Lactobacillus plantarum* PH04 pela redução do colesterol sérico e no nível de triglicerídios em camundongos.

#### 4.3.11 Identificação Bioquímica

Levando em conta as características morfológicas e fisiológicas das 50 cepas avaliadas procedeu-se a identificação bioquímica. Para o teste foram escolhidas as dez cepas com as características tecnológicas mais apropriadas para a utilização como culturas *starter* na produção de salames. Para a seleção das cepas foram levadas em consideração as seguintes características: capacidade de acidificação, crescimento em meio contendo 3% de cloreto de sódio associado a 200 ppm de nitrito, crescimento em meio com pH 3,0, tolerância aos sais biliares, resistência acidez e pouca ou nenhuma produção de dextrana, gás e peróxido de hidrogênio.

Pela análise do perfil bioquímico apresentado pelas culturas das cepas de lactobacilos avaliadas, 9 foram classificadas como *Lactobacillus plantarum* e uma

como possível *Lactobacillus pentosus* (Tabela 6). Os resultados da fermentação das diferentes fontes de carbono do sistema API 50CHL pelas dez cepas de lactobacilos avaliadas estão apresentados no Quadro 5. Verificou-se uma variação na capacidade de utilização das diferentes fontes de carbono entre as cepas de *L. plantarum* identificadas. A cepa de *L. plantarum* 202 não utiliza como única fonte de carbono L-arabinose e D-turanose. A cepa identificada como *L. plantarum* 364 não utiliza L-arabinose, galactose, D-rafinose e D-turanose, e a cepa de *L. plantarum* 503 não possui capacidade de utilizar como única fonte de carbono D-rafinose e D-turanose em seu metabolismo.

TABELA 6 – RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO DOS LACTOBACILOS SELECIONADOS DE ACORDO COM O PERFIL BIOQUÍMICO APRESENTADO

CEPAS	CLASSIFICAÇÃO	PROBABILIDADE (%)	IDENTIFICAÇÃO
103	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97,9	Boa
194	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98,5	Boa
202	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,7	Muito boa
212	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97,9	Boa
221	<i>Lactobacillus pentosus</i>	84,1	Duvidosa
283	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,3	Muito boa
341	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,4	Muito boa
364	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9	Muito boa
442	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9	Muito boa
503	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,8	Muito boa

QUADRO 5 – PERFIL BIOQUÍMICO DE 10 CEPAS DE LACTOBACILOS AVALIADAS

FONTES DE CARBONO	CEPAS DE LACTOBACILOS AVALIADAS									
	103	194	202	212	221	283	341	364	442	503
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	v	v	-	-	+	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Ribose	+	+	v	+	+	+	+	+	v	+
D-xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ - metil xiloside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	v	-	-	v	v	-	v	-	v	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ Metil-D-manoside	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
$\alpha$ Metil-D-glucoside	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
N Acetilglucosamida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celubiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+
D-rafinose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Amido	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicogênio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
D-Lixose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitól	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitól	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	v	v	v	-	v	v	v	v	v	v
2 Ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 Ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: (+) reação positiva; (-) reação negativa; (v) reação variável (indefinida)

#### 4.3.11 Atividade Antimicrobiana Frente a Microrganismos de Importância em Alimentos

A capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos ou deteriorantes de importância em alimentos é um dos critérios utilizados para selecionar cepas de bactérias lácticas, com o propósito de utilizar como culturas iniciadoras na produção de salames fermentados (BUCKENHÜSKES, 1993).

A produção de biocinas pelas cepas de bactérias lácticas em caldo MRS foi verificada pela capacidade de inibir cepas de microrganismos com importância em alimentos. Nos testes realizados, a grande maioria das cepas de bactérias lácticas não foi capaz de inibir o crescimento desses microrganismos. Em alguns casos, principalmente para o caldo concentrado (CC) sem ajuste do pH, ocorreu uma leve inibição, que foi verificada pela formação de halos discretos devido ao crescimento reduzido dos microrganismos indicadores.

Os resultados da atividade antimicrobiana referente ao teste com os discos de MRSA contendo as culturas das 10 cepas de *Lactobacillus*, frente a diferentes cepas de microrganismos de importância em alimentos, estão descritos no Quadro 6.

QUADRO 6 – RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TESTE COM OS DISCOS DE ÁGAR MRS CONTENDO AS DIFERENTES CULTURAS DE *Lactobacillus* ISOLADAS DOS SALAMES

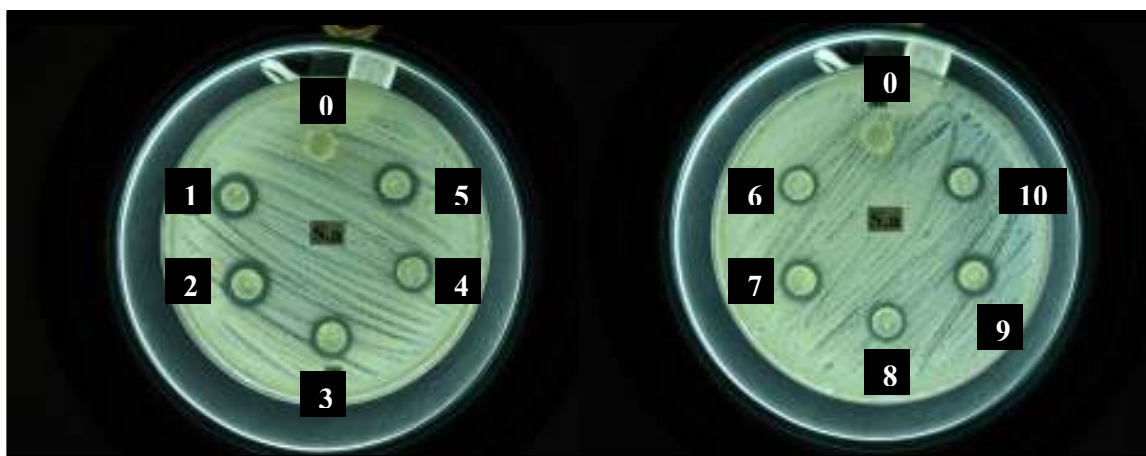
CEPAS	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>
	halos de inibição (mm)				
<i>L. plantarum</i> 103	0	0,5	2	5	0,5
<i>L. plantarum</i> 194	1	1,5	2,55	5,4	1,65
<i>L. plantarum</i> 202	0,5	0,5	2,25	4,3	1,5
<i>L. plantarum</i> 212	1	2	3	4,65	1,65
<i>L. pentosus</i> 221	0	1	2	5	0,5
<i>L. plantarum</i> 283	1	0,5	1,9	6	0
<i>L. plantarum</i> 341	0,5	0,5	0,8	5	0
<i>L. plantarum</i> 364	1,5	2,5	2,3	7,5	0
<i>L. plantarum</i> 442	1,5	0,5	2	6,4	0
<i>L. plantarum</i> 503	0,5	2	3	6,85	0
Controle	0	0	0	0	0



A atividade antimicrobiana frente à cepa de *Salmonella* testada foi discreta ou não ocorreu, sendo que as cepas de *L. plantarum* 364 e 442 foram as mais eficientes. Da mesma forma, a ação frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* foi limitada.

Todas as cepas de *Lactobacillus* provocaram inibição do crescimento de *S. aureus* (Figura 11). Verificou-se que existem diferenças entre as cepas de *Lactobacillus* quanto à ação antimicrobiana, pela formação de halos de diferentes tamanhos (Quadro 6).

FIGURA 11 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TESTE COM OS DISCOS DE ÁGAR MRS CONTENDO AS DIFERENTES CULTURAS DE *Lactobacillus* ISOLADAS DOS SALAMES FRENTE À CEPA DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

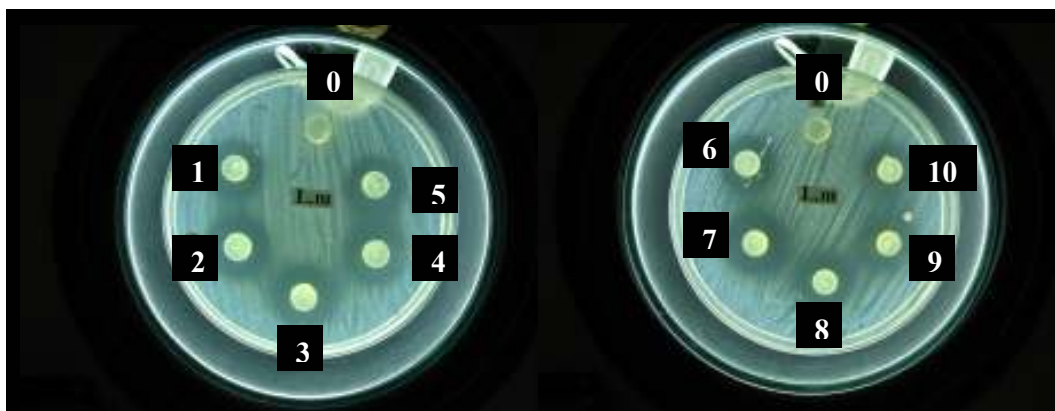


FONTE: O AUTOR.

NOTA: 0 – controle; 1 – *L. plantarum* 103; 2 – *L. plantarum* 194; 3 – *L. plantarum* 202; 4 – *L. plantarum* 212; 5 – *L. penntosus*; 6 – *L. plantarum* 283; 7 – *L. plantarum* 341; 8 – *L. plantarum* 364; 9 – *L. plantarum* 442; 10 – *L. plantarum* 503.

A maior ação antimicrobiana pelas cepas de *Lactobacillus* testadas foi verificada frente à cepa de *L. monocytogenes* (Quadro 6). Todas as cepas formaram zonas de inibição com halos de 4,3 a 7,5 mm (Figura 12). A ação antimicrobiana de bactérias lácticas frente a *L. monocytogenes* foi verificada em vários estudos. Essa característica tem sido explorada com o objetivo de selecionar culturas *starter* com potencial bioprotetor, para aumentar a segurança e a qualidade dos alimentos (O'SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002; MATARAGAS; DROSINOS; METAXOPOULOS, 2003; TYÖPPÖNEN et al., 2003; URSO et al., 2006)

FIGURA 12 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TESTE COM OS DISCOS DE ÁGAR MRS CONTENDO AS DIFERENTES CULTURAS DE *Lactobacillus* ISOLADAS DOS SALAMES FRENTE À CEPA DE *Listeria monocytogenes* ATCC 19111

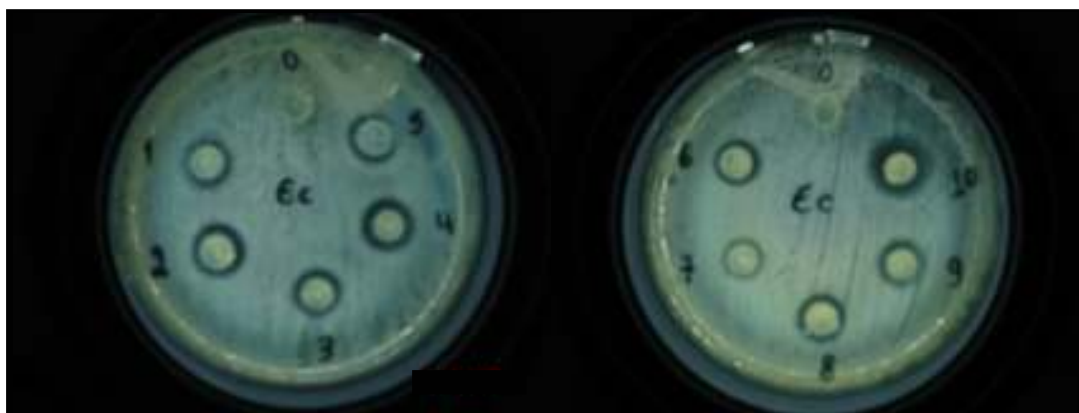


FONTE: O AUTOR

NOTA: 0 – controle; 1 – *L. plantarum* 103; 2 – *L. plantarum* 194; 3 – *L. plantarum* 202; 4 – *L. plantarum* 212; 5 – *L. pentosus*; 6 – *L. plantarum* 283; 7 – *L. plantarum* 341; 8 – *L. plantarum* 364; 9 – *L. plantarum* 442; 10 – *L. plantarum* 503.

No teste realizado para verificar a atividade antimicrobiana frente à cepa de *Escherichia coli*, observou-se a formação de zonas de inibição de crescimento (Figura 13) ao redor de todas as cepas de *Lactobacillus* testadas.

FIGURA 13 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TESTE COM OS DISCOS DE ÁGAR MRS CONTENDO AS DIFERENTES CULTURAS DE *Lactobacillus* ISOLADAS DOS SALAMES FRENTE À CEPA DE *Escherichia coli* ATCC 25922



FONTE: O AUTOR

NOTA: 0 – controle; 1 – *L. plantarum* 103; 2 – *L. plantarum* 194; 3 – *L. plantarum* 202; 4 – *L. plantarum* 212; 5 – *L. pentosus*; 6 – *L. plantarum* 283; 7 – *L. plantarum* 341; 8 – *L. plantarum* 364; 9 – *L. plantarum* 442; 10 – *L. plantarum* 503.

As cepas de *L. plantarum* 212 e 503 causaram a maior inibição (Quadro 6), formado uma zona de 3 mm ao redor do disco. Na Figura 13 podem ser visualizados os halos formados devido à inibição do crescimento da cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) pelas 10 cepas de bactérias lácticas isoladas de salames obtidos por fermentação espontânea.

Após uma análise geral das características tecnológicas, da atividade probiótica e da capacidade bioprotetora das dez cepas identificadas, foram selecionadas as cepas de *L. plantarum* 503 e 341 para serem testadas como culturas *starter* na produção de salames.

#### 4.4 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DAS CEPAS DE *Lactobacillus plantarum* 503 E 341 EM CALDO MRS

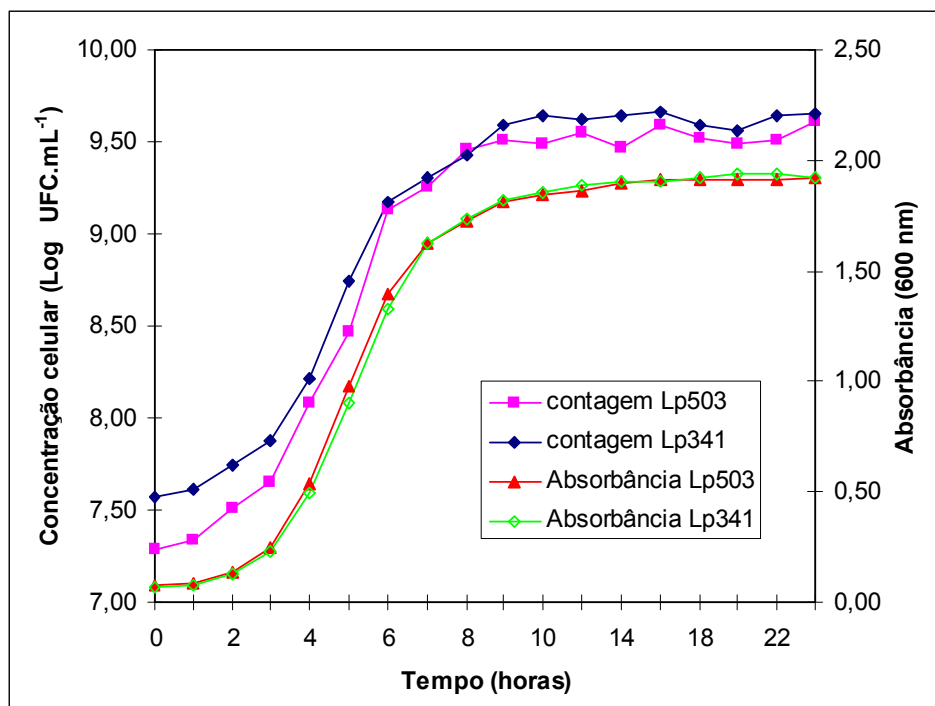
Para culturas *starter*, é importante a capacidade de multiplicação, pois quando adicionadas durante o processamento se leva em consideração a quantidade de células viáveis, para que o processo tecnológico ocorra de forma adequada. No gráfico da Figura 14 pode ser observada a curva de crescimento das cepas de *L. plantarum* 503 e 341.

Pela análise dos dados do crescimento microbiano verificou-se que a fase de crescimento bacteriano denominada como logarítmica (log) ou exponencial iniciou-se após duas horas de incubação, sendo que o final da fase foi observado após oito horas de fermentação. O tempo de geração nesta fase foi de 50,1 minutos para a cepa de *Lactobacillus plantarum* 503 e de 56,9 minutos para a cepa 341.

O conhecimento do tempo de duração da fase logarítmica é de fundamental importância, pois é o ponto que se deve encerrar a fermentação quando o objetivo é produção de biomassa para a utilização como *starter*. No final dessa fase todas as células estão metabolicamente ativas e a concentração celular atingiu seu máximo (PELCZAR Jr; CHAN; KRIEG, 1996).

A produção de biomassa pelas cepas de *L. plantarum* 503 e 341 foi semelhante, a quantidade de células produzidas ao final de 24 horas de incubação foi de 9,61 e 9,65 log UFC.ml<sup>-1</sup>, respectivamente.

FIGURA 14 – CURVA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS DE *Lactobacillus. plantarum* 503 E 341 QUANDO CULTIVADAS EM CALDO MRS.



#### 4.4 SALAMES ELABORADOS COM AS CEPAS SELECIONADAS DE *L. plantarum* 503 E 341

Para avaliar os efeitos das culturas *starter* selecionadas, bem como a capacidade de ação antioxidante do extrato de pólen em salames, foi implantado um experimento constituído por quatro partidas de salames (Figura 15), conforme descrito no item 3.4. O experimento foi conduzido em câmara de maturação de acordo com as condições estabelecidas no item 3.4.

A influência dos diferentes tratamentos de cada partida foi verificada pelas alterações ocorridas em parâmetros microbiológicos e físico-químicos durante o processamento. Também foi realizada a caracterização físico-química do produto acabado com o objetivo de verificar se o mesmo atende aos padrões de qualidade para salame italiano estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2000). E por último, foi realizada a avaliação sensorial do produto final, com o objetivo de verificar o efeito dos tratamentos sobre os atributos sensoriais dos salames e sua aceitação.

FIGURA 15 – PARTIDAS DE SALAMES PRODUZIDAS PARA AVALIAR O EFEITO DAS CULTURAS *STARTER* SELECIONADAS



FONTE: O AUTOR

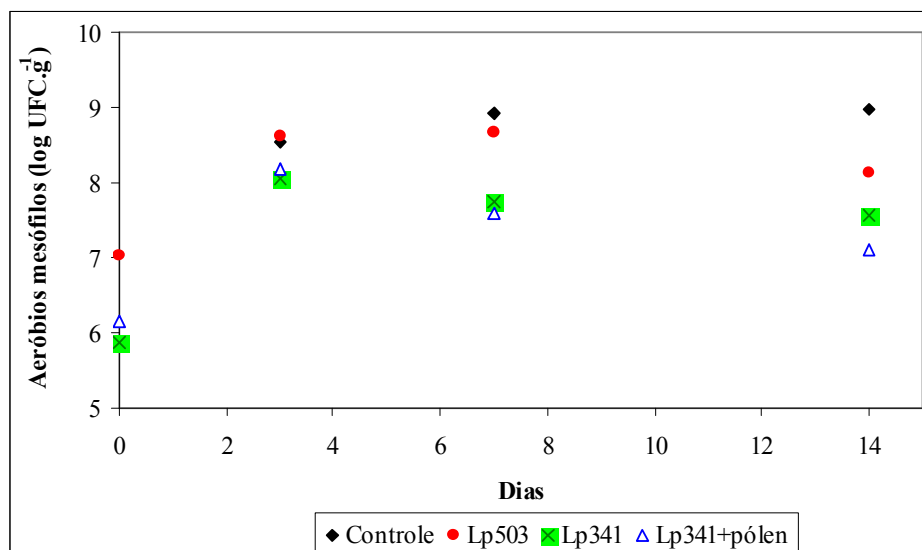
NOTA: A – controle; B – tratamento Lp503; C – tratamento Lp 341; D – tratamento Lp341+pólen.

#### 4.4.1 Alterações Microbiológicas dos Salames Ocorridas Durante o Processamento

##### 4.4.1.1 Bactérias aeróbias mesófilas

A quantidade de bactérias aeróbias mesófilas do controle no dia 0 (zero) foi inferior aos demais tratamentos (Figura 16). Isso deve ter ocorrido provavelmente devido ao fato de que as culturas *starter* utilizadas não estavam totalmente ativas ou a quantidade utilizada foi inferior aos demais tratamentos, pois a quantidade de bactérias lácticas (Figura 17) do controle no dia 0 (zero) também foi inferior aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ).

FIGURA 16 – EVOLUÇÃO NA QUANTIDADE DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES



A população de bactérias aeróbias mesófilas aumentou no decorrer do processamento dos salames, no 3º dia a quantidade foi superior a 8 log UFC.g<sup>-1</sup> para todos os tratamentos e se manteve nesse patamar até o 14º dia para os tratamentos controle e Lp503.

BOZKURT; ERKMEN (2002), avaliando os efeitos da adição de culturas *starter* e aditivos na qualidade do salame típico da Turquia, denominado de *sucuk*, obtiveram contagens de bactérias aeróbias mesófilas semelhantes aos encontrados neste trabalho. Em estudos de caracterização de salames típicos da Grécia, Itália e Espanha obtidos por fermentação espontânea foi observado que a quantidade de bactérias aeróbias mesófilas no produto final também se mantém em torno de 8 log UFC.g<sup>-1</sup> (SAMELIS et al., 1994; MAURIELLO; CASABURI; VILLANI, 2004; MORETTI et al., 2004; COMI et al., 2005; DROSINOS et al., 2005).

#### 4.4.1.1 Bactérias lácticas

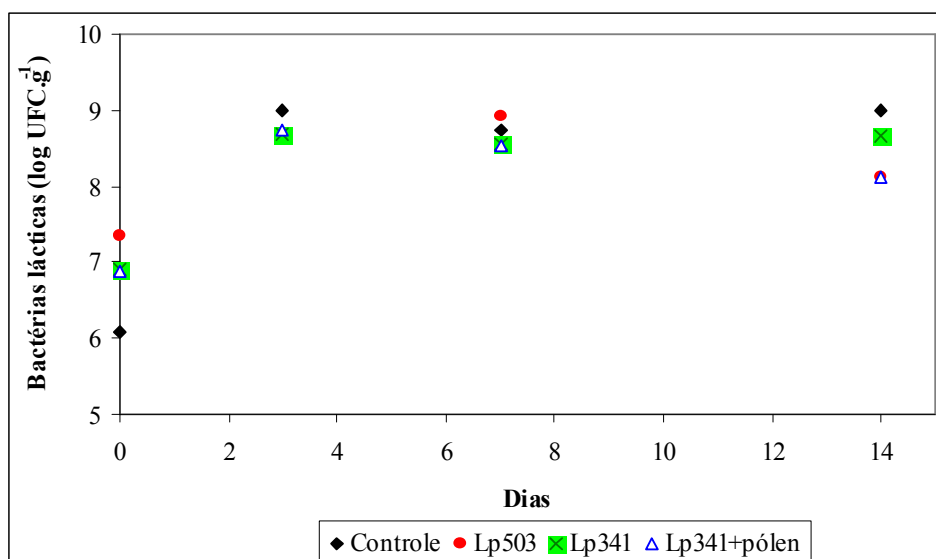
A evolução da população de bactérias lácticas durante o processamento dos salames está apresentada na Figura 17. Para todos os tratamentos, a quantidade de

bactérias lácticas durante o processamento dos salames aumentou rapidamente nos primeiros dias, chegando ao máximo no 3º dia de fermentação e depois se manteve constante até o final do processamento. Essas observações estão de acordo com descritas por outros autores (IBAÑEZ et al., 1996; HERRANZ et al., 2003).

A adaptação dessas estirpes ao ambiente cárneo e às condições de processamento utilizadas provavelmente foram as principais responsáveis pela rápida multiplicação das bactérias na massa cárnea. Durante o desenvolvimento das bactérias lácticas, a metabolização de carboidratos leva à formação de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, com conseqüente queda do pH. A diminuição do pH é de fundamental importância durante o processamento, pois contribui com a formação de diversas características dos salames, bem como com a estabilidade microbiológica (HAMMES; BANTLEON; MIN, 1990; HUGAS; MONFORT, 1997).

A quantidade de bactérias lácticas nos salames, para todos os tratamentos, foi em sua grande maioria superior ao número encontrado para bactérias aeróbias mesófilas totais, nos diferentes tempos avaliados. Essa predominância também foi observada em estudos realizados por SAMELIS et al. (1998) e COMI et al. (2005) em salames obtidos por fermentação espontânea.

FIGURA 17 – EVOLUÇÃO NA QUANTIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES





Pela análise do gráfico apresentado na Figura 17, pode-se observar que a quantidade de bactérias lácticas do tratamento controle no dia 0 (zero) foi inferior aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ). Entretanto, já no 3º dia, a quantidade de bactérias lácticas do tratamento controle foi superior a todos os tratamentos, diferindo ( $P < 0,05$ ) somente do tratamento Lp503. Essa superioridade também se manteve no fim do processamento (14º dia), sendo significativa ( $P < 0,05$ ) para os tratamentos Lp503 e Lp341+pólen.

Avaliando a evolução da quantidade de bactérias lácticas nos salames dos tratamentos Lp341 e Lp341 adicionado de extrato de pólen, constatou-se que a presença de extrato de pólen não interferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) no tamanho da população do produto acabado (14º dia).

Em salames típicos produzidos em diversos países, obtidos sem a adição de culturas *starter*, as bactérias lácticas são os microrganismos dominantes durante todo o período de fermentação, geralmente excedendo a  $8 \log \text{UFC.g}^{-1}$  no final do processamento. Durante o período de armazenamento, a tendência é ocorrer uma diminuição lenta na população desse grupo de bactérias (COMI et al., 2005; DROSINOS et al., 2005; GRECO et al., 2005). Porém, são encontrados dados aonde a quantidade de bactérias lácticas não chega a  $8 \log \text{UFC.g}^{-1}$  no produto acabado (SANZ et al., 1997; ANSORENA et al., 2002).

LEBERT et al. (2007) verificaram que a média de bactérias lácticas em salames fermentados, elaborados por pequenas indústrias tradicionais da França, durante a fermentação e no produto final foi de 6,5 e  $7,9 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , respectivamente. MACEDO (2005) verificou que após 150 dias de armazenamento sob refrigeração, de salames elaborados com culturas probióticas, a quantidade desses microrganismos foi superior a  $8 \log \text{UFC.g}^{-1}$ .

O desenvolvimento das bactérias lácticas durante a fermentação pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: a cepa de *starter* utilizada (ERKKILÄ et al., 2001), as condições de processamento (SANZ et al., 1997; MORETTI et al., 2004), a quantidade e o tipo de açúcar adicionado (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al.,



2003), o tipo de sal utilizado (IBAÑEZ et al., 1996) e o teor de gordura da massa cárnea (SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005).

#### 4.4.1.1 *Staphylococcus* spp.

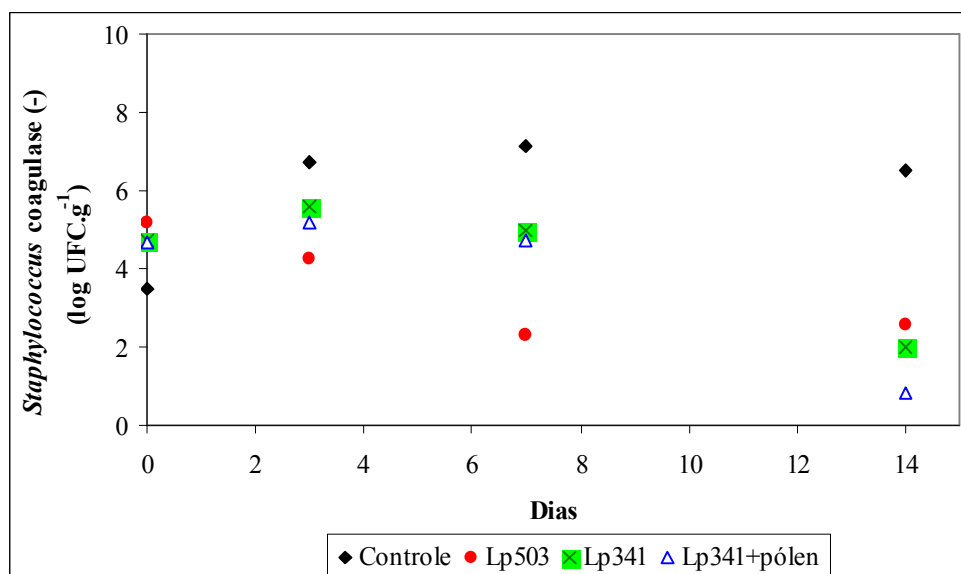
A evolução da quantidade de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) nas diferentes partidas de salames estão apresentados na Figura 18. Semelhante ao ocorrido no dia 0 para bactérias lácticas, a quantidade de SCN no controle foi inferior aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ). Porém, após 3 dias de fermentação, a população aumentou mais de 3 log UFC.g<sup>-1</sup> e se manteve estável até o 14º dia, sendo superior aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Nas partidas de salames que utilizaram os *starter* Lp503 e Lp341, as populações de SCN foram semelhantes entre si no dia 0 ( $P < 0,05$ ). Durante o processamento a quantidade de SCN não teve um aumento significativo, atingindo valores inferiores a 3 log UFC.g<sup>-1</sup> no produto final (14º dia). Os resultados provavelmente são devido ao fato de que o pH dos salames desses tratamentos foram inferiores ao do controle (Figura 20). Isso ocorre devido à pouca competitividade dos *Staphylococcus* na presença de crescimento ativo de bactérias ácido-lácticas (SANZ et al., 1997; PAPAMANOLI et al., 2002; MAURIELLO; CASABURI; VILLANI, 2004; DROSINOS et al., 2005).

O desenvolvimento limitado de SCN em salames pode comprometer a qualidade do produto final. Esses microrganismos estão relacionados com o desenvolvimento e a estabilidade da coloração, redução da oxidação lipídica, bem como contribui com a formação do *flavour* característico do produto, devido à produção de lípases e proteases (MONTEL; MASSON; TALON, 1998; SONDERGAARD; STAHNKE, 2001).

As diferenças na população de SCN verificadas entre os tratamentos não interferiram na qualidade da coloração do produto final, avaliada tanto instrumentalmente como pelo teste sensorial (Tabela 7 e Tabela 9, respectivamente).

FIGURA 18 – EVOLUÇÃO NA QUANTIDADE DE *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVA DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES



MACEDO (2005) verificou que em salames elaborados com culturas *starter*, a quantidade de *Staphylococcus xylosus* no final do processamento foi superior a 6 log UFC.g<sup>-1</sup> para três tratamentos, sendo que para o tratamento “*starter* + *Lactobacillus paracasei* + extrato antioxidante de marcela do campo”, a quantidade ficou abaixo de 4 log UFC.g<sup>-1</sup>. Durante o armazenamento ocorreu uma redução gradativa na população de *S. xylosus*.

A quantidade de *Micrococcaceae* em salames fermentados, mesmo para aqueles obtidos sem a adição de culturas *starter*, é bastante variável. Entretanto, a população desses microrganismos no produto final geralmente é superior a 4 log UFC.g<sup>-1</sup> (SAMELIS et al., 1994; SAMELIS et al., 1998; BOVER-CID; IZQUIERDO-PULIDO; VIDAL-CAROU, 1999; COPPOLA et al., 2000; GARDINI et al., 2002; COMI et al., 2005). Porém, salames com quantidades de *Micrococcaceae* inferiores a 4 log UFC.g<sup>-1</sup> também são observados (PAPAMANOLI et al., 2002; DROSINOS et al., 2005).

LEBERT et al. (2007) estudando a diversidade de microrganismos em salames fermentados tradicionais da França, elaborados por pequenas indústrias, verificaram

que a média de *Staphylococcus* no início do processamento foi de 4,2 log UFC.g<sup>-1</sup>. Durante a fermentação e no produto final ocorreu um aumento na população desses microrganismos, sendo de 5,4 e 6,5 log UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os salames produzidos neste trabalho atendem o estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001) em relação à quantidade de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), pois em todas as partidas de salames não foi observada a presença desses microrganismos, nos períodos analisados. Isso significa que a matéria-prima e os ingredientes utilizados possuíam boa qualidade sanitária, bem como as condições higiênicas durante a elaboração dos salames foram adequadas. Esse grupo de microrganismos merece atenção especial, pois seu principal representante, o *Staphylococcus aureus*, tem sido responsabilizado por causar doenças de origem alimentar vinculada a esses produtos. Isso ocorre pela capacidade que esses microrganismos possuem em produzir toxinas durante o seu desenvolvimento nos alimentos (BARBUTI; PAROLARI, 2002; SILVA; GANDRA, 2004; PEREIRA, 2004).

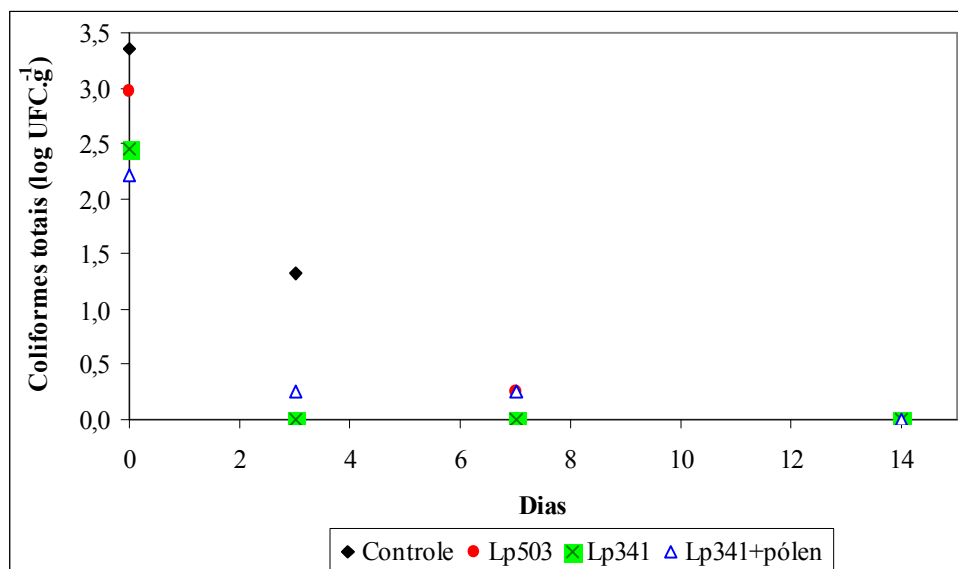
#### 4.4.1.1 Coliformes totais e fecais

A evolução da presença de bactérias do grupo coliformes totais, nos diferentes dias de processamento dos salames, está apresentada na Figura 19. A quantidade de bactérias do grupo coliformes totais no dia 0 foi maior nos tratamentos controle e Lp503 (P<0,05). Durante o período de fermentação (até o 7º dia) ocorreu uma diminuição da população desses microrganismos, atingindo valores inferiores a 1 log UFC.g<sup>-1</sup>.

A progressiva eliminação das bactérias do grupo coliforme durante o processo de fermentação confirma a superioridade competitiva das bactérias lácticas em relação à flora endógena, e também a dificuldade do desenvolvimento das bactérias do grupo coliforme em pH baixo. O fato ocorre tanto para salames elaborados com a adição de culturas *starter*, como para aqueles produzidos por fermentação espontânea (SANZ; et

al., 1997; SAMELIS et al., 1998; BOVER-CID; IZQUIERDO-PULIDO; VIDAL-CAROU, 1999; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2003; DROSINOS et al., 2005).

FIGURA 19 – EVOLUÇÃO NA QUANTIDADE DE COLIFORMES TOTAIS DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES



Em salames fermentados elaborados por nove pequenas indústrias da França, a média de *Enterobacteriaceae* encontrada na massa cárnea foi de 4,0 log UFC.g<sup>-1</sup>, sendo que durante a etapa de fermentação a população teve um pequeno aumento e permaneceu em torno de 4,3 log UFC.g<sup>-1</sup>. No produto final foi observada uma diminuição na quantidade desses microrganismos, tendo como média de 2,3 log UFC.g<sup>-1</sup> (LEBERT et al., 2007).

A presença de coliformes fecais não foi observada em todas as partidas de salames. Os resultados indicam que as matérias-primas utilizadas na elaboração dos salames foram obtidas em condições higiênico-sanitárias adequadas, como também, as condições de manipulação durante o processamento foram apropriadas. Pois, o principal representante do grupo coliforme fecal é a *Escherichia coli*, que tem como habitat primário o trato intestinal do homem e dos animais, sendo indicadora de contaminação fecal (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Assim sendo, os salames

produzidos neste experimento estão de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001).

#### 4.4.2 Alterações Físico-Químicas Ocorridas Durante o Processamento dos Salames

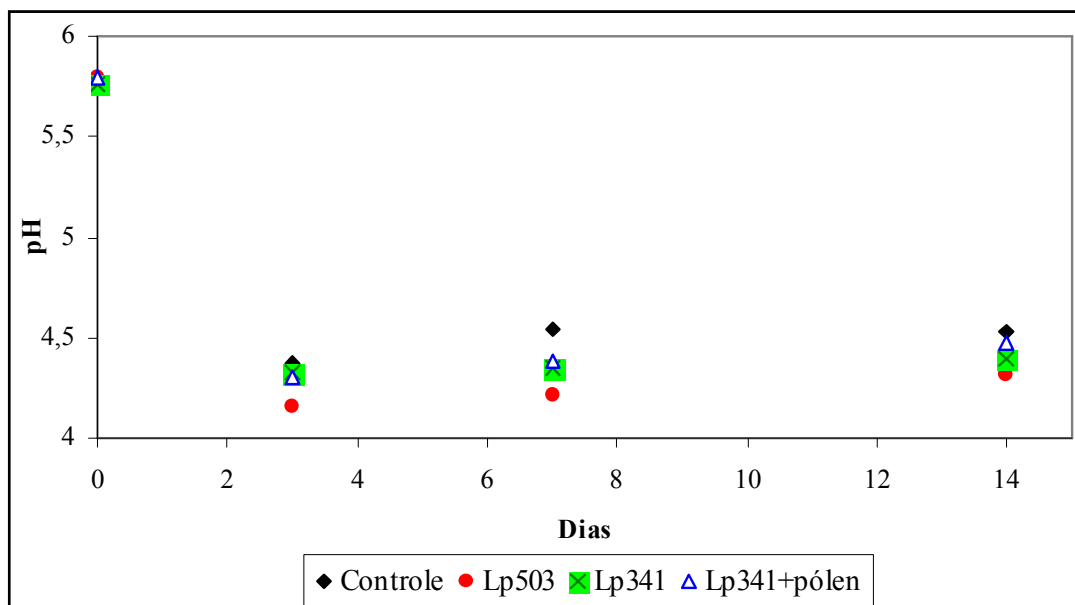
##### 4.4.2.1 Alterações no pH

A preservação de alimentos por fermentação depende do processo de oxidação parcial dos carboidratos, gerando principalmente ácidos, álcool e dióxido de carbono (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). A diminuição do pH é o responsável pela preservação. Em salames, a queda do pH ocorre fundamentalmente pelo acúmulo de ácido láctico, resultante da metabolização dos carboidratos adicionados na massa cárnea, que ocorre durante a etapa de fermentação por ação das bactérias lácticas (ZALACAIN et al., 1995; LÜCKE, 2000). Em salames elaborados com a adição de culturas *starter* ocorre uma queda mais rápida do pH nos primeiros dias de fermentação (GARDINI et al., 2002).

As alterações ocorridas no valor do pH dos salames durante o processamento estão apresentadas na Figura 20. O pH inicial dos salames (dia 0) foi igual para todos os tratamentos ( $5,8 \pm 0,00$ ). As mudanças nos valores do pH das amostras nos diferentes tempos avaliados foram significativas. Após 3 dias de fermentação, o pH dos salames de todos os tratamentos caiu para valores inferiores a 4,5. Essa grande acidificação está relacionada com o período de maior desenvolvimento das bactérias lácticas nos salames (Figura 17).

No 3º dia de fermentação, os salames com os menores valores de pH foram observados para os tratamentos Lp503 e Lp341+pólen, os quais diferiram significativamente do controle ( $P < 0,05$ ). Durante o período de maturação não ocorreram alterações significativas no pH para todos os tratamentos. No produto final (14º dia), os valores de pH dos salames de todos os tratamentos diferiram entre si ( $P < 0,05$ ).

FIGURA 20 – ALTERAÇÕES NO VALOR DO pH DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES



Após o 3º dia de fermentação, para todos os tratamentos, ocorreu um aumento nos valores do pH dos salames. Essa elevação no valor do pH durante a etapa de maturação dos salames está de acordo com o encontrado em vários outros salames fermentados (SAMELIS et al., 1994; GARDINI et al., 2002; GRECO et al., 2005). O fato se deve provavelmente pelo aumento da atividade proteolítica, com a formação de peptídeos, aminoácidos e compostos nitrogenados não protéicos (BOVER-CID; IZQUIERDO-PULIDO; VIDAL-CAROU, 1999; SANZ et al., 1997; FRANCO et al., 2002; HERRANZ et al., 2003; DURÁ; FLORES; TOLDRÁ, 2004).

Conforme os resultados obtidos, verificou-se que a queda no pH dos salames também depende da cultura *starter* utilizada, onde a maior capacidade de acidificação foi observada na partida de salame elaborada com a cepa Lp503. Uma maior redução no pH pela cepa Lp503 (3,80), em relação a Lp341 (4,04), também foi observada no teste realizado para verificar a capacidade de acidificação em caldo MRS, durante a etapa de seleção das cepas. Diferenças na capacidade de acidificação de salames pela utilização de diferentes culturas *starter* também foram observadas em outros estudos (ERKKILÄ et al., 2001; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2003; KOMPRDA et al., 2004).

A variação no pH final dos salames pode ser influenciada por diversos fatores. Em salames produzidos com diferentes aditivos, tais como o sorbato de potássio, pirofosfato de potássio e difosfato de potássio foi verificada uma elevação no valor do pH à medida que aumentou a quantidade de aditivos adicionados (BOZKURT; ERKMEN, 2002). A adição de cravo da Índia provoca uma redução no pH (SCHEID et al., 2003). A substituição parcial de NaCl por KCl ocasionou uma redução de 5,24 para 4,71 no pH final dos salames (IBAÑEZ et al., 1996). A adição de diferentes tipos de açúcar (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2003), bem como, as condições de processamento (MORETTI et al., 2004) e a quantidade de gordura adicionada na massa interferem no valor final do pH dos salames (SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005).

Em salames produzidos com a adição de culturas *starter*, a redução do pH é mais significativa e estável, mesmo que a quantidade de bactérias lácticas no produto final seja similar. Isso ocorre devido à maior capacidade de acidificação das culturas *starter* em relação à microbiota nativa (SANZ et al., 1997). Salames elaborados sem a adição de culturas *starter* apresentam valores de pH entre 4,6 e 5,0, ao passo que aqueles produzidos com a adição de culturas *starter* geralmente possuem pH final entre 4,0 e 4,5 (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Em salames fermentados produzidos por pequenas indústrias da França, o pH após a fermentação variou de 5,04 a 5,73, sendo que no produto final o valor do pH ficou entre 5,21 e 6,39 (LEBERT et al., 2007).

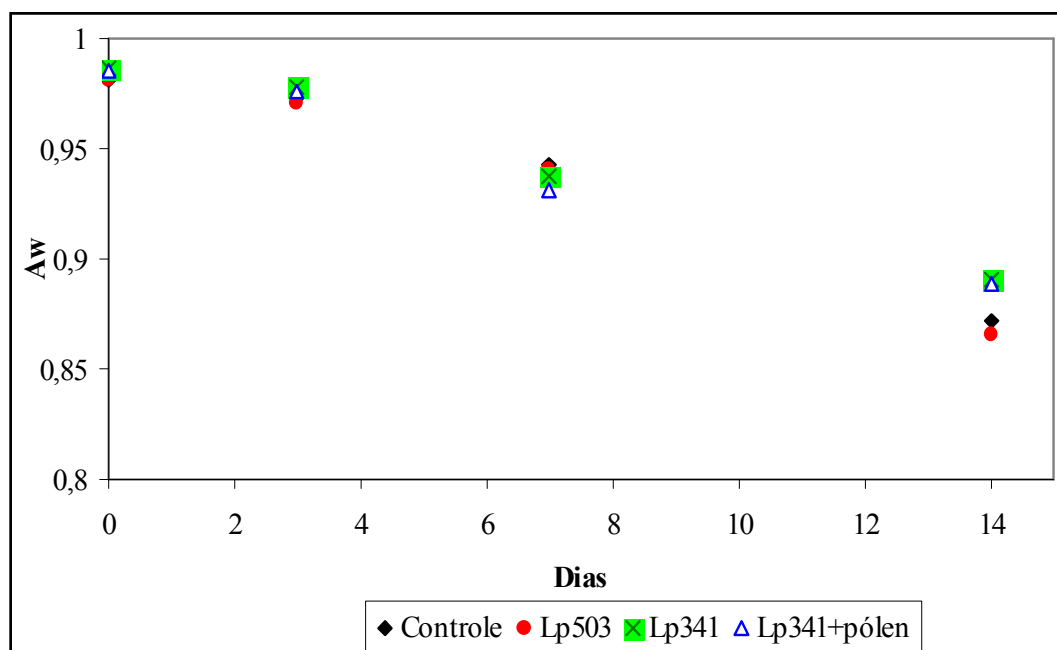
Pela análise de literatura específica, verificou-se que o pH final dos salames fermentados típicos de diversos países é bastante variável, sendo que na grande maioria os valores são próximos de 5,0 (SAMELIS et al., 1994; LORENZO et al., 2000; ANSORENA et al., 2002; FRANCO et al., 2002; COMI et al., 2005; DROSINOS et al., 2005; GRECO et al., 2005). Neste trabalho, o pH final dos salames para todas as partidas ficou em torno de 4,5, sendo substancialmente menor dos encontrados na literatura. Isso justifica as baixas contagens de bactérias do grupo coliforme.

#### 4.4.2.2 Alterações na atividade de água

Segundo a Instrução Normativa que estabelece os Padrões de Identidade e Qualidade para Salames (BRASIL, 2000), o valor máximo aceitável da  $A_w$  para o salame tipo italiano é de 0,90. Sendo assim, o processamento do salame só pode ser finalizado quando a  $A_w$  do produto atingir esse valor.

A evolução da  $A_w$  durante o processamento para todas as partidas de salames está apresentada na Figura 21. A pequena redução na  $A_w$  dos salames até o 3º dia está relacionada com as condições de processamento da câmara de fermentação/maturação (Tabela 3). A umidade relativa é um dos fatores que interferem na desidratação dos salames, cabe ressaltar que neste período a umidade relativa foi superior a 90%. Durante o período de maturação (7º-14º dia), a umidade da câmara foi mantida a 75% para facilitar o processo de desidratação e conseqüentemente reduzir a  $A_w$  dos salames, que atingiram valores inferiores a 0,90 para todos os tratamentos.

FIGURA 21 – ALTERAÇÕES NO VALOR DA ATIVIDADE DE ÁGUA DURANTE O PROCESSAMENTO DAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES





A redução da  $A_w$  dos salames também está relacionada com a diminuição do pH. Quando o pH se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas ocorre uma diminuição na capacidade de retenção de água, facilitando a desidratação e conseqüentemente a redução na  $A_w$  dos salames (MAURIELLO et al., 2004).

Além do pH, vários outros fatores podem interferir na  $A_w$  final dos salames. SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU (2005) verificaram que a temperatura e o tempo de maturação, e a quantidade de gordura influenciaram no valor da  $A_w$  final dos salames. A quantidade e o tipo do sal adicionado aos salames também podem ocasionar alterações na  $A_w$  final do produto (IBAÑEZ et al., 1996).

#### 4.4.2.4 Alterações no peso

A desidratação dos salames é uma conseqüência natural de seu processo de produção. A desidratação do produto depende de vários fatores, tais como a redução do pH, o diâmetro dos salames e as condições da câmara de maturação durante o processamento. A evolução da perda de peso ocorrida durante o processamento dos salames está apresentada na Figura 22.

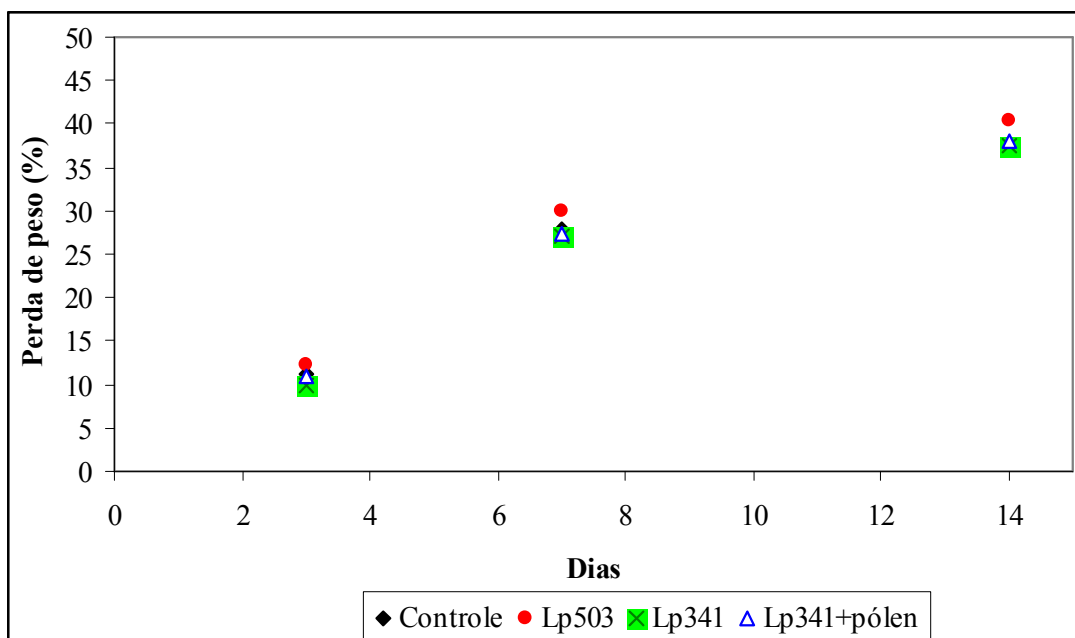
Os salames do tratamento Lp503 tiveram uma perda de peso mais acentuada quando comparada com os demais tratamentos, em todos os tempos avaliados, porém essa diferença não foi significativa ( $P < 0,05$ ). O tratamento Lp503 também foi o que apresentou as maiores reduções nos valores do pH e da  $A_w$ .

No final do processamento (14º dia), a perda de peso dos salames dos diferentes tratamentos foi de: controle 37,60% ( $\pm 0,66$ ), Lp503 40,41% ( $\pm 0,79$ ), Lp341 37,55% ( $\pm 0,52$ ) e Lp341+pólen 38,02% ( $\pm 1,62$ ). MACEDO (2005) encontrou valores de perda de peso entre 30,46% e 38,18% em salames elaborados com cultura probiótica. CAMPOS (2002) verificou perda de peso ao final do processamento em salame tipo italiano entre 37,9% e 40,7%. Dessa forma, os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes aos citados anteriormente.

Pela análise dos resultados obtidos, verificou-se que a utilização de diferentes culturas *starter*, bem como a utilização do extrato de pólen como antioxidante não

provocou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) no parâmetro perda de peso dos salames durante todo o processamento.

FIGURA 22 – PERDA DE PESO DOS SALAMES DURANTE O PROCESSAMENTO



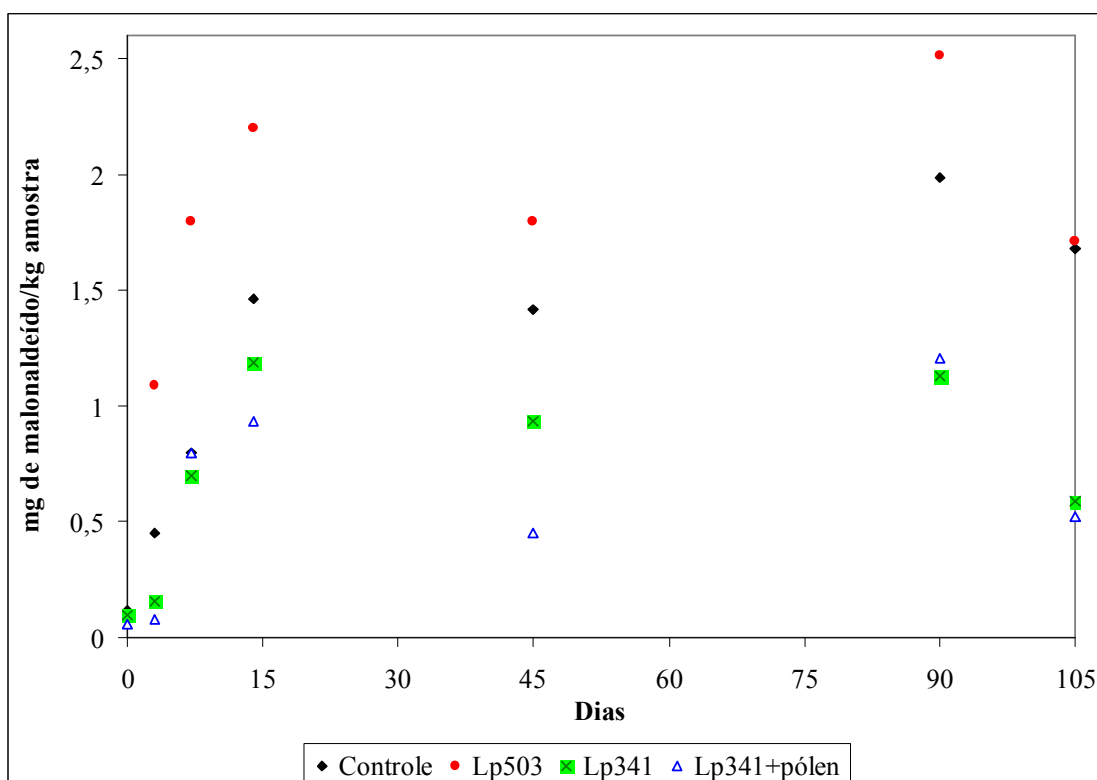
A diminuição da quantidade de água dos salames, durante o período de maturação, é um dos principais fatores responsáveis pela textura do produto final (FERNÁNDEZ et al., 2000). Nesse período também ocorre o desenvolvimento da *flavour* dos salames, por uma série de reações químicas e bioquímicas envolvendo as proteínas, as gorduras e os carboidratos (MONTEL; MASSON; TALON, 1998). Além de contribuir com a textura, a redução da  $A_w$  dos salames é mais uma barreira ao desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas, assim sendo, aumenta a estabilidade e a segurança alimentar (HUGAS; MONFORT, 1997).

#### 4.4.2.4 Alterações na oxidação lipídica

Um dos constituintes das formulações de salame tipo italiano adicionado na massa cárnea é o toucinho. A quantidade adicionada deve ser adequada para que o teor

de gordura seja inferior a 32% no produto acabado, valor máximo estabelecido pelos Padrões de Identidade e Qualidade para Salame Italiano (BRASIL 2000). A principal deterioração do toucinho é a rancificação, que além de ocasionar alterações no sabor e aroma, pode provocar o escurecimento dos salames (TERRA, 1998). A evolução na oxidação lipídica durante o processamento e o armazenamento dos salames está apresentada na Figura 23.

FIGURA 23 – ALTERAÇÕES NO VALOR DO TBARS DURANTE O PROCESSAMENTO E O ARMAZENAMENTO NAS DIFERENTES PARTIDAS DE SALAMES



Os valores de TBARS dos salames aumentaram gradualmente durante o processamento para todos os tratamentos. O tratamento Lp503 apresentou os maiores valores de TBARS, diferindo significativamente ( $P < 0,05$ ) de todos os outros tratamentos, exceto no dia 0 (zero). No produto acabado (14º dia), o menor valor de TBARS foi observado no tratamento Lp341+pólen, o qual diferiu significativamente dos tratamentos controle e Lp503.

A atividade antioxidante do extrato de pólen em salames foi confirmada, pois no produto acabado (14º dia), a quantidade de malonaldeído no tratamento Lp341+pólen ( $0,94 \pm 0,06 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) foi inferior ao do tratamento controle ( $1,46 \pm 0,07 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e semelhante ao tratamento Lp341 ( $1,19 \pm 0,16 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) ( $P < 0,05$ ), sendo que nos dois últimos tratamentos foram adicionados antioxidante sintético. Após 105 dias, todos os tratamentos diferiram significativamente entre si. Esse resultado é importante, visto que o pólen é um produto natural. A substituição de antioxidantes sintéticos por naturais é positiva para a saúde humana, pois alguns antioxidantes sintéticos possuem atividade carcinogênica (BOZKURT, 2006).

Pelos resultados obtidos, verifica-se que a utilização de diferentes culturas *starter* provocou alterações no valor do TBARS. Isso pode ser causado pela capacidade que algumas espécies de bactérias lácticas possuem em produzir peróxidos (LORENZO et al., 2000). Porém, no estudo inicial realizado para selecionar culturas com propriedades tecnológicas adequadas para a utilização na produção de salames, não foi observada a produção de peróxido de hidrogênio por essas cepas.

A busca por uma alimentação saudável pelos consumidores tem levado pesquisadores e indústrias de alimentos a buscar novas alternativas. Cada vez mais são realizados estudos visando a substituição de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais, obtidos principalmente de fontes vegetais. MACEDO (2005) verificou que a utilização de extrato de marcela do campo (*Achryrocline satureioides*) diminui a oxidação, reduzindo de 2,26 ( $\pm 0,007$ ) para 1,74 ( $\pm 0,17$ ) mg de malonaldeído/kg em salames elaborados com cultura probiótica. MACEDO (2005) também cita um estudo onde ocorreu uma redução na oxidação em salames quando elaborados com extrato natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

BOZKURT (2006) verificou que a adição de antioxidantes naturais (extrato de chá e óleo de *Thymbra spicata*) reduziu a formação de TBARS em salames em relação ao tratamento com antioxidante sintético (BHT)

Os valores de TBARS encontrados na literatura para salames são muito variáveis. LORENZO et al. (2000), avaliando as características bioquímicas de salames tradicionais da Espanha, encontraram valores entre 0,15 a 2,96 mg de

malonaldeído/kg para o salame denominado de “Botillo” e de 0,27 a 15,4 mg de malonaldeído/kg para o salame denominado de “Androlla”.

BOZKURT; ERKMEN (2002) relatam que salames elaborados com culturas *starter* apresentam um menor TBARS em relação aos elaborados sem culturas *starter*. Os autores também verificaram que a adição de aditivos reduziu o valor do TBARS dos salames. Porém, a quantidade de malonaldeído para todos os tratamentos foi elevada, superior a 5 mg de malonaldeído/kg após 15 dias de maturação.

ZALACAIN et al. (1995) verificaram que substituição da cultura *starter* pela adição de lipases provocou uma redução, porém não significativa na quantidade de malonaldeído, sendo de 1,19 ( $\pm 0,05$ ) e 1,08 ( $\pm 0,06$ ), respectivamente. Entretanto, a redução foi significativa ( $P < 0,05$ ) quando adicionaram lipase juntamente com a cultura *starter* (ZALACAIN et al., 1996).

A inoculação superficial de *Penicillium camemberti* em salames reduziu a quantidade de malonaldeído em relação ao controle, sendo de 0,50 e 0,63 mg de malonaldeído/kg, respectivamente. Essa proteção contra a oxidação lipídica pode ser atribuída à barreira formada pelo micélio, que dificulta a passagem da luz e do oxigênio e pela produção de catalase por essa cepa (BRUNÁ et al., 2003).

MACEDO (2005) em experimento realizado para elaborar salame com cultura probiótica (*Lactobacillus paracasei*), encontrou valores entre 1,74 ( $\pm 0,17$ ) e 2,75 ( $\pm 0,26$ ) mg de malonaldeído/kg no final do processamento (28º dia). Esses valores são superiores aos encontrados neste trabalho, exceto para o tratamento Lp503 que obteve 2,20 ( $\pm 0,21$ ) mg de malonaldeído/kg.

AHMAD; SRIVASTAVA (2007) citam trabalhos onde amostras de carne com número de TBARS entre 0,5 e 1,0 não foi verificado odor de ranço. Os autores ainda relatam que valores de TBARS entre 1-2 mg/kg de malonaldeído situam-se na faixa detectada sensorialmente.

#### 4.4.2.4 Alterações na cor

Os resultados obtidos na avaliação da cor dos salames no final do processamento (14º dia) e durante 90 dias de armazenamento estão apresentados na Tabela 7. No final do processamento (14º dia), os tratamentos Lp341 e Lp341+pólen apresentaram maiores valores de luminosidade ( $L^*$ ), porém, as diferenças não foram significativas ( $P < 0,05$ ). Entretanto, após 105 dias essa diferença foi significativa. Valores mais elevados de luminosidade podem ter sido causados pelo maior teor de umidade dos salames destes tratamentos (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

MACEDO (2005), em estudo realizado para elaborar salames com culturas lácticas probióticas, obteve valores de luminosidade ( $L^*$ ) que variaram de 41,98 e 47,76 no final do processamento (28 dias) e após 105 dias de armazenamento os valores ficaram entre 41,84 a 52,65.

TABELA 7 – VALORES MÉDIOS DA LUMINOSIDADE ( $L^*$ ), COR VERMELHA ( $a^*$ ) E COR AMARELA ( $b^*$ ) DOS SALAMES NO FINAL DO PROCESSAMENTO E DURANTE O ARMAZENAMENTO

Dias	Tratamentos	$L^*$	$a^*$	$b^*$
14	Controle	$44,57 \pm 0,48^a$	$24,87 \pm 0,58^a$	$12,55 \pm 0,39^a$
	Lp503	$46,27 \pm 1,93^a$	$26,13 \pm 0,92^a$	$14,02 \pm 0,83^a$
	Lp341	$49,64 \pm 3,68^a$	$25,26 \pm 0,29^a$	$13,27 \pm 0,49^a$
	Lp341+pólen	$48,25 \pm 4,31^a$	$26,21 \pm 1,75^a$	$13,22 \pm 1,29^a$
45	Controle	$46,29 \pm 0,71^a$	$18,96 \pm 0,53^{ab}$	$16,95 \pm 0,78^a$
	Lp503	$46,32 \pm 0,86^a$	$19,50 \pm 0,90^a$	$17,38 \pm 0,70^a$
	Lp341	$49,88 \pm 1,69^b$	$17,94 \pm 0,27^b$	$17,08 \pm 0,31^a$
	Lp341+pólen	$44,01 \pm 1,61^a$	$20,21 \pm 0,46^a$	$17,15 \pm 0,33^a$
90	Controle	$43,62 \pm 1,17^a$	$19,05 \pm 0,26^a$	$17,71 \pm 0,37^a$
	Lp503	$42,62 \pm 0,86^a$	$21,25 \pm 0,49^b$	$18,58 \pm 0,40^a$
	Lp341	$44,70 \pm 1,08^a$	$20,24 \pm 0,21^{cd}$	$18,02 \pm 0,41^a$
	Lp341+pólen	$45,24 \pm 1,02^a$	$19,61 \pm 0,41^{ad}$	$17,69 \pm 0,43^a$
105	Controle	$45,82 \pm 1,58^a$	$21,67 \pm 0,42^a$	$19,34 \pm 0,68^a$
	Lp503	$46,37 \pm 1,87^a$	$21,69 \pm 0,54^a$	$19,96 \pm 0,80^a$
	Lp341	$51,08 \pm 0,53^b$	$18,40 \pm 0,94^b$	$17,04 \pm 0,55^b$
	Lp341+pólen	$49,87 \pm 0,42^b$	$19,90 \pm 0,51^b$	$17,66 \pm 0,39^b$

No final do processamento (14º dia), os valores para a cor vermelha variaram de 24,87 no controle a 26,21 no tratamento Lp341+pólen. Em relação à intensidade da cor amarela ( $b^*$ ), o menor valor foi observado para o tratamento controle (12,55) e o maior para o tratamento Lp503, porém essas diferenças de coloração não foram significativas ( $P < 0,05$ ). Entretanto, após 105 dias foram verificadas diferenças significativas dos tratamentos elaborados com a cultura *starter* Lp341 em relação ao controle e ao tratamento elaborado com a cultura *starter* Lp503, tanto para o índice de cor vermelha quanto para o de cor amarela (Tabela 7).

CAMPAGNOL et al. (2007) verificaram que a intensidade de brilho ( $L^*$ ) de salames elaborados com *L. plantarum* diminuiu ao longo dos 21 dias de processamento. No início do processamento, os valores de  $L^*$  ficaram entre 52,77 e 53,64, já no final desse período foram encontrados valores de 37,22 a 38,70. Em relação à cor vermelha ocorreu o contrário, os valores de  $a^*$  aumentaram até o 14º dia de processamento, decorrido este período uma pequena diminuição na intensidade de cor vermelha foi verificada, sendo que os valores ficaram entre 18,85 e 20,74. Para o índice de cor amarela ocorreu uma diminuição durante o processamento, sendo que no produto acabado os valores ficaram entre 6,89 e 7,88.

#### 4.4.3 Qualidade dos Salames

Parâmetros físicos, bem como a composição química dos alimentos são utilizados para avaliar sua qualidade. A Instrução Normativa Nº 22, de 31 de julho de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), em seu anexo XII, estabelece as características mínimas de qualidade que deverá obedecer o produto cárneo denominado Salame Tipo Italiano (BRASIL, 2000).

As características físico-químicas dos salames no final do processamento (14º dia) estão apresentadas na Tabela 8. A quantidade de água dos salames de todos os tratamentos diferiu significativamente entre si ( $P < 0,05$ ). Nos tratamentos Lp341 e Lp341+pólen, foram observados os maiores teores de umidade e, conseqüentemente, maiores valores de Aw. Porém, esses valores atendem os requisitos do Regulamento

Técnico de Identidade e Qualidade para Salame Tipo Italiano (BRASIL, 2000), que estabelece valor máximo de  $A_w$  de 0,90 e no máximo 35% de umidade.

MACEDO (2005) obteve teores de umidade entre 36,55% e 42,54% para salames elaborados com cultura probiótica. Resultados semelhantes foram verificados em salames obtidos por CAMPOS (2002) onde a umidade variou de 38,7% a 43,6%. CASTRO; LUCHESE; MARTINS (2000) verificaram que a utilização de *Penicillium nalgiovense* não alterou o teor de umidade dos salames após 30 dias de maturação, obtendo valores em torno de 35%. Em estudo para caracterizar salames típicos da Espanha (*Androlla*), LORENZO et al., (2000) encontraram valores de umidade entre 28,9% a 55,1%.

O teor de umidade dos salames pode ser alterado pela quantidade e tipo de sal adicionado à formulação. A substituição parcial de NaCl por KCl ocasionou uma menor perda de água, onde a umidade foi de 25,42% para 31,58%, respectivamente (IBAÑEZ et al., 1996).

TABELA 8 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS SALAMES NO FINAL DO PROCESSAMENTO (14º DIA)

TRATAMENTO	$A_w$	UMIDADE (%)	PROTEÍNAS (%)	LIPÍDEOS (%)
Controle	$0,87 \pm 0,01^a$	$27,68 \pm 0,13^a$	$28,27 \pm 0,15^a$	$34,83 \pm 0,67^a$
Lp503	$0,87 \pm 0,01^a$	$26,70 \pm 0,27^b$	$28,79 \pm 0,33^a$	$34,59 \pm 1,13^a$
Lp341	$0,89 \pm 0,01^b$	$32,33 \pm 0,14^c$	$27,02 \pm 0,21^b$	$31,68 \pm 0,47^a$
Lp341 + pólen	$0,89 \pm 0,01^b$	$31,59 \pm 0,13^d$	$26,61 \pm 0,16^b$	$32,30 \pm 0,29^a$

Em relação ao teor de proteínas, ocorreu uma menor variação entre as amostras. Os tratamentos controle e Lp503, que possuem teores de umidade mais baixos, apresentaram quantidade de proteínas superior ( $P < 0,05$ ) aos tratamentos que foram elaborados com a cultura *starter* Lp341. Todos os tratamentos apresentaram teores de proteínas acima de 25%, valor mínimo estabelecido para o produto (BRASIL, 2000).

Para o teor de gordura, a legislação específica (BRASIL, 2000) permite no máximo 32%. Nos salames de todos os tratamentos, a quantidade de gordura ficou muito próxima, porém abaixo desse valor, não sendo observada diferença significativa entre diferentes partidas de salames ( $P < 0,05$ ).



MACEDO (2005) ressalta que durante o processamento, a perda de água, devido à desidratação, promove a concentração dos demais componentes. Em seu trabalho obteve salames com teores de proteínas entre 21,81% e 24,78% e teores de gordura entre 28,77% e 33,17%, após 28 dias de processamento.

#### 4.4.3 Avaliação Sensorial dos Salames

##### 4.4.2.4 Perfil de características

A avaliação sensorial dos salames foi realizada após 15 dias de armazenamento. Os julgadores (33) avaliaram os seguintes atributos de qualidade: gosto ácido, sabor, aroma, cor, textura e aspecto (aparência visual). Os valores médios obtidos na avaliação sensorial relativo ao perfil de características dos salames estão apresentados na Tabela 9.

Pela análise dos resultados obtidos, verificou-se que não houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre as amostras de salames para os diferentes atributos avaliados. Os salames têm como característica peculiar o gosto ácido. Em relação a esse atributo, o tratamento controle foi caracterizado como o menos ácido. Cabe ressaltar que o tratamento controle também foi o que apresentou o maior valor de pH final (Figura 20).

TABELA 9 – VALORES MÉDIOS ATRIBUÍDOS PELOS JULGADORES NO TESTE DO PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DOS SALAMES

ATRIBUTOS	CONTROLE	LP503	LP341	LP341+PÓLEN
Gosto ácido	5,52 $\pm$ 1,87	5,88 $\pm$ 1,71	6,27 $\pm$ 1,57	6,21 $\pm$ 1,78
Sabor	6,70 $\pm$ 1,81	6,39 $\pm$ 1,52	7,12 $\pm$ 1,60	6,85 $\pm$ 1,68
Aroma	6,70 $\pm$ 1,33	6,39 $\pm$ 1,48	6,91 $\pm$ 1,47	6,61 $\pm$ 1,32
Cor	7,36 $\pm$ 1,39	7,52 $\pm$ 1,25	7,15 $\pm$ 1,64	6,94 $\pm$ 1,39
Textura	6,70 $\pm$ 1,78	7,15 $\pm$ 1,73	7,15 $\pm$ 1,52	7,00 $\pm$ 1,71
Aspecto	7,67 $\pm$ 1,49	7,52 $\pm$ 1,68	7,42 $\pm$ 1,68	7,45 $\pm$ 1,62

Em relação ao sabor dos salames, as melhores médias foram observadas para os tratamentos Lp341 e Lp341+pólen. Esses tratamentos também foram caracterizados pelos provadores como os mais ácidos. O tratamento Lp341 obteve também a melhor

média para o atributo aroma, sendo que o tratamento Lp503 foi o menos preferido. O *flavour* característico dos salames é proveniente dos condimentos adicionados à massa cárnea, bem como da degradação de carboidratos, proteínas e lipídios que ocorrem durante o processamento e o armazenamento dos salames (MONTEL; MASSON; TALON, 1998).

O *flavour* é o mais importante atributo sensorial que afeta a qualidade de produtos cárneos. Durante o armazenamento dos salames, a rancificação se torna mais pronunciada, resultando na redução no valor do *flavour* (AMBROSIADIS et al., 2004). Uma menor avaliação do aroma e do sabor foi observado em salames após 54 dias de armazenamento quando comparado com o final do processamento (MACEDO, 2005).

AMBROSIADIS et al. (2004) verificaram em salames tradicionais da Grécia que o teor de gordura influenciou no *flavour*, sendo que os salames com menos de 15% e mais de 35% receberam as menores notas. Os autores também verificaram que as amostras com maiores escores em relação ao *flavour* foram as melhores avaliadas em relação à aparência.

Tem sido sugerido que diferenças na atividade metabólica, entre as cepas ou espécies de microrganismos, resultam na produção de salames com variações no *flavour* (MONTEL; MASSON; TALON, 1998). Em salames elaborados com diferentes cepas de *Lactobacillus* (*plantarum*, *rhannosus*, *sakei*) e uma de *P. pentosaceus* não foram observadas diferenças significativas no perfil do *flavour* entre os salames dos diferentes tratamentos. Os autores justificam que os condimentos utilizados podem ter anulado as pequenas diferenças causadas no perfil do *flavour* produzidas pelos microrganismos (ERKKILÄ et al., 2001).

Salames elaborados com *Lactobacillus sakei*, produtores de bacteriocinas, resultaram em um produto com características sensoriais específicas, não só reconhecidas pelos provadores, como também preferida quando comparada com os salames obtidos com *starter* comercial (URSO et al., 2006).

A cor é a primeira característica sensorial apreciada pelo consumidor. Uma coloração mais forte foi observada nos salames do tratamento Lp503, seguida pelo

tratamento controle, porém esta diferença não foi significativa. Os salames desses tiveram os menores valores de umidade, com conseqüente concentração dos pigmentos responsáveis pela cor vermelha. Pela análise dos valores da medida instrumental de parâmetros de cor também não foi verificada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os salames das diferentes partidas, no início do armazenamento (Tabela 9).

MACEDO (2005) verificou que os valores da avaliação sensorial da cor dos salames, após o processamento (28 dias), diferiram entre os tratamentos. Sendo que o tratamento “*starter* + *L. paracasei* + extrato antioxidante de marcela do campo” recebeu a melhor avaliação, seguido do tratamento elaborado somente com a cultura *starter* comercial.

A elaboração de salames com a inoculação de *L. plantarum* e *S. xylosus* não provocou alterações sensoriais perceptíveis na cor, aroma e textura. Porém, o sabor desses salames foi superior aos salames produzidos sem a adição de culturas *starter* ou aqueles produzidos com a adição de *starter* comercial, contendo *Pediococcus pentosaceus* e *S. xylosus* (CAMPAGNOL et al., 2007).

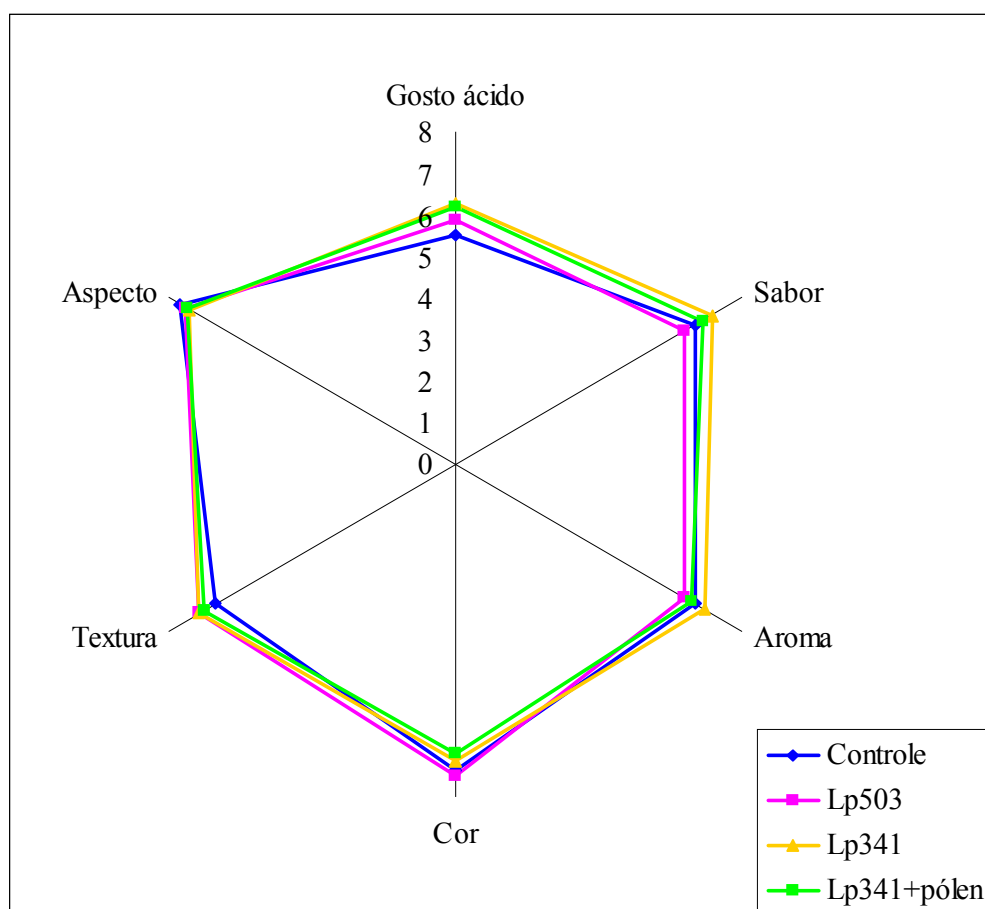
A textura dos salames é influenciada pela umidade final do produto, portanto todos os fatores que interferem no processo de desidratação dos salames podem provocar alterações na textura (FERNÁNDEZ et al., 2000). Pelos resultados obtidos na análise sensorial, as diferenças verificadas no teor de umidade entre os tratamentos (Tabela 4) não interferiram na textura dos salames. Em estudo realizado para avaliar a influencia das diferentes condições de processamento, nos atributos sensoriais dos salames, foram verificadas alterações na dureza e na rancificação, sendo que o *flavour* não foi afetado (MORETTI et al., 2004).

Em relação ao aspecto, todas as amostras receberam notas acima de 7, em uma escala estruturada de nove pontos, indicando que a aparência visual dos salames foi apreciada pelos provadores. Uma análise geral do perfil das principais características dos salames, obtido na avaliação sensorial, está representado graficamente na Figura 24.

A inoculação de *P. camemberti* na superfície de salames contribui positivamente no desenvolvimento de características sensoriais de salames

fermentados, resultando na melhora da cor e do *flavour*. A textura dos salames também foi influenciada pela presença do bolor, causando diminuição na firmeza. Esse decréscimo foi justificado pela atividade lipolítica e proteolítica desenvolvidas pelo fungo, bem como pelos valores mais elevados de pH observados no tratamento inoculado com *P. camemberti* (BRUNÁ et al., 2003).

FIGURA 24 – PERFIL DAS CARACTERÍSTICAS DOS SALAMES



#### 4.4.2.4 Ordenação de acordo com a preferência

Após avaliar os atributos dos salames, os julgadores ordenaram as amostras de acordo com sua preferência. Pelos resultados obtidos no teste, os salames dos tratamentos Lp341 e Lp341+pólen tiveram a maior preferência, seguido pelos

tratamentos controle, e finalmente o tratamento Lp503, que teve a menor preferência. No entanto, as diferenças não foram significativas quando os dados foram analisados pelo teste de Friedman (DUTCOSKY, 2007).

Pelos resultados obtidos na avaliação sensorial, as cepas de *Lactobacillus plantarum* 503 e 341 isoladas de salames obtidos por fermentação espontânea podem ser utilizadas como culturas *starter* na produção de salames com características sensoriais semelhantes aos produzidos com a utilização de culturas *starter* comercial. A seleção de cepas nativas de produtos específicos, o estudo de suas características e a eventual utilização como culturas *starter* na elaboração de produtos com *flavour* específico oferecem uma alternativa à utilização aos *starter* comerciais que nem sempre produzem resultados satisfatórios (URSO et al., 2006; TALON et al., 2007).

## 5 CONCLUSÃO

Os salames artesanais, elaborados por fermentação espontânea, produzidos por pequenas indústrias, possuem características físicas e composição química bastante variável.

Com relação aos parâmetros físico-químicos avaliados, apenas 46% das amostras de salames artesanais avaliadas estão de acordo com os padrões fixados pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade para o produto denominado Salame.

A concentração dos microrganismos responsáveis pelo processo fermentativo dos salames artesanais, obtidos por fermentação espontânea, fabricados por pequenas indústrias do setor de carnes foi bastante variável.

Com relação aos parâmetros microbiológicos avaliados nas amostras de salames artesanais, foi verificada a presença de coliformes fecais em 38% das amostras, *Staphylococcus* coagulase positiva em 30% e de *Listeria monocytogenes* em 8%. Não sendo verificada a presença de *Salmonella*.

Ficou comprovada a necessidade de uma maior fiscalização e a implantação de programas que atentam para a melhoria da qualidade dos salames, produzidos pelas pequenas indústrias, para proporcionar aos consumidores um produto seguro e de qualidade.

Na avaliação das características tecnológicas das cepas de bactérias lácticas isoladas, 50% produziram peróxido de hidrogênio, 66% sintetizam dextrana a partir de sacarose e somente 2% produziram gás a partir da glicose.

As cepas de bactérias lácticas apresentaram capacidade de acidificação com valores de pH entre 3,56 e 4,52. Foram capazes de crescer em pH 4 e 5, entretanto 10% não se desenvolveram em meio com pH 3.

Todas as cepas tiveram crescimento na presença de 3%, 5% e 8% de cloreto de sódio, exceto uma que não se desenvolveu na presença 200 ppm de nitrito de sódio.

Verificou-se que 96% das cepas de bactérias lácticas avaliadas isoladas de salames artesanais são resistente à acidez e 100% são tolerantes aos sais biliares.

Das dez cepas de bactérias lácticas que apresentaram as melhores características tecnológicas, nove foram identificadas bioquimicamente como *Lactobacillus plantarum* e uma como *Lactobacillus* sp.

Todas as cepas de *Lactobacillus plantarum* e a cepa de *Lactobacillus* sp. apresentaram atividade antibiótica frente às cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, porém a ação inibitória mais efetiva foi verificada frente à cepa e *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.

Os salames elaborados com a adição de culturas *starter* de *Lactobacillus plantarum* 503 e 341 tiveram uma maior redução do pH. Os valores de atividade de água e os teores de umidade, proteínas e gorduras estão de acordo com o estabelecido pelo regulamento para salame tipo italiano.

A utilização de extrato de pólen apícola, como antioxidante natural, ocasionou uma redução nos valores das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico dos salames no final do processamento e após 90 de armazenamento, demonstrando apresentar atividade antioxidante.

Na avaliação sensorial e no teste de preferência, não foram verificadas diferenças significativas entre os salames elaborados com as culturas *starter* selecionadas de *Lactobacillus plantarum* 503 e 341 e o tratamento controle.

Comprovou-se que as culturas *starter* de *Lactobacillus plantarum* 503 e 341 selecionadas de salames artesanais podem ser utilizadas na elaboração de salame tipo italiano.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, S.; SRIVASTAVA, P. K. Quality and shelf life evaluation of fermented sausages of buffalo meat with different levels of heart and fat. **Meat Science**, v. 75, p. 603-603, 2007.

AMBROSIADIS, J.; SOULTOS, N.; ABRAHIM, A.; BLOUKAS, J. G. Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. **Meat Science**, v. 66, p. 279-287, 2004.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v. 17, p. 454-461, 2006.

ANSORENA, D.; MONTEL, M. C.; ROKKA, M.; TALON, R.; EEROLA, S.; RIZZO, A.; RAEMAEEKERS, M.; DEMEYER, D. Analysis of biogenic amine in northern and southern European sausages and role of flora in anime production. **Meat Science**, v. 61, p. 141-147, 2002.

AOAC – **Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis**. 17 ed. Washington, 2000. 1219 p.

BARBUTI, S.; PAROLARI, G. Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. **Meat Science**, v. 62, p. 323-329, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of biochemistry and physiology**, v. 37, p. 911-915, 1959.

BONVEHI, J. S.; TORRENTÓ, M. S.; LORENTE, E. C. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 1848-1853, 2001.

BOVER-CID, S.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp., on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 95-104, 1999.

BOZKURT, H. Utilization of natural antioxidants: green tea extract and Thymbra spicata oil in turkish dry-fermented ausage. **Meat Science**, v. 73, p. 442-450, 2006.

BOZKURT, H.; ERKMEN, O. Effects of starter culture and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk). **Meat Science**, v. 61, p. 149-156, 2002.



BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 22 de 31 de junho de 2000, Anexo V. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 ago. 2000. Disponível em: <[http://www.engetecno.com.br/legislacao/carnes\\_salame.htm](http://www.engetecno.com.br/legislacao/carnes_salame.htm)> Acesso em: 24 jun. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do abastecimento. Instrução Normativa nº 55 de 07 de julho de 2003. Altera o subitem nº 4.2.2, dos anexos V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII e XIII, da Instrução Normativa nº 22, de 31 de junho de 2000, referente aos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Salames. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 28, 08 de julho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília 2 jan. 2001 Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01.rdc.htm>> Acesso em: 24 jun. 2006.

BRUNA, J. M.; HIERRO, E. M.; HOZ, L.; MOTTRAM, D. S.; FERNÁNDEZ, M.; ORDÓÑEZ, J. A. Changes in selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 111-125, 2003.

BUCKENHÜSKES, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 253-272, 1993.

BUJALANCE, C.; MORENO, E.; JIMENEZ-VALERA, M.; RUIZ-BRAVO, A. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 28-34, 2007.

CAMPAGNOL, P. C. B.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N.; SANTOS, B. A.; FURTADO, S. S. Salame elaborado com *Lactobacillus plantarum* fermentado em meio de cultura de plasma suíno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 883-889, 2007.

CAMPOS, R. M. L. **Influência da alimentação na qualidade da carcaça suína e do pernil para a fabricação de salame tipo italiano**. Santa Maria, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 131-149, 1999.

- CARIONI, F. O.; PORTO, A. C. S.; PADILHA, J. C. F.; SANT'ANNA, E. S. Uso de culturas iniciadoras para a elaboração de um embutido à base de carne de pato (*Cairina moschata*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 334-338, 2001.
- CARPES, S. T.; BEGNIMI, R. ALENCAR, S. M., MASSON, M. L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. **Ciênc. Agrotec.**, v. 31, p 1818-1825, 2007.
- CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; MAURIELLO, G.; PEPE, O.; VILLANI, F. Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. **Meat Science**, v. 71, p. 643-650, 2005.
- CASTRO, L. C.; LUCHESE, R. H.; MARTINS, J. F. P. Efeito do uso da cepa starter de *Penicillium nalgiovense* na qualidade de salames. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 40-46, 2000.
- CICHOSKI, A. J.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Teoria dos obstáculos (*hurdle technology*) em produtos cárneos curados. **Higiene Alimentar**, v. 18, p. 33-36, 2004.
- COMI, G.; URSO, R.; IACUMIN, L; RANTSIOU, K.; CATTANEO, P.; CANTONI, C.; COCOLIN, L. Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. **Meat Science**, v. 69, p. 381-392, 2005.
- COPPOLA, S.; MAURIELLO, G.; APONTE, M.; MOSCHETTI, G.; VILLANI, F. Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. **Meat Science**, v. 56, p. 321-329, 2000.
- DICKS, L. M. T.; MELLETT, F. D.; HOFFMAN, L. C. Use of bacteriocin-producing starter culture of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. **Meat Science**, v. 66, p. 703-708, 2004.
- DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; MOSCHONAS, G.; GAITIS, F.; METAXOPOULOS. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, p. 307-317, 2005.
- DURÁ, M. A.; FLORES, M.; TOLDRÁ, F. Effect of *Debaryomyces* spp. On the proteolysis of dry-fermented sausages. **Meat Science**, v. 68; p. 319-328, 2004.
- DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. Curitiba: Champagnat, 2007. 123 p.
- ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p. 297-300, 2000.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E.; EEROLA, S.; LILLEBERG, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SUIHKO, M-L. *Flavour* profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter culture. **Meat Science**, v. 59, p. 111-116, 2001.

FERNÁNDEZ, M.; ORDÓÑEZ, J. A.; BRUNA, J. M.; HERRANZ, B.; HOZ, L. Accelerated ripening of dry fermented sausages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 201-209, 2000.

FLORES, M.; DURÁ, M. A.; MARCO, A.; TOLDRÁ, F. Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. **Meat Science**, v. 68, p. 439-446, 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2007. 169 p.

FRANCO, I.; PRIETO, B.; CRUZ, J. M.; LÓPEZ, M.; CARBALLO, J. Study of the biochemical changes during the processing of Androlla, a Spanish dry-cured pork sausage. **Food Chemistry**, v. 78, p. 339-345, 2002.

GAIO, I.; SAGGIORATO, A. G.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; CICHOSKI, A. J.; VALDUGA, A. T. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. em salames. In: IX Encontro Regional sul de Ciências e Tecnologia de Alimentos (2007: Curitiba). **Anais**. Curitiba: ERSCTA, 2007.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 1-15, 2007.

GARCÍA-VARONA, M.; SANTOS, E. M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Characterization of Micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 189-195, 2000.

GARDINI, F.; MARTUSCELLI, M.; CRUDELE, M.A.; PAPARELLA, A.; SUZZI, G. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. **Meat Science**, v. 61, p. 275-283, 2002.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial population during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 251-260, 2004.

GIRAUD, E. **Contribution a l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique esolée du mandioc fermenté**. Marseille, 1992. 139 f. Thèse. Université de Provence aix-Marseille.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; SANTOS, E. M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Influence of starter culture and sugar concentration on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. **Food Microbiology**, v. 20, p. 275-284, 2003.

GRECO, M.; MAZZETTE, R.; DE SANTIS, E. P. L.; CORONA, A.; COSSEDDU, A. M. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. **Meat Science**, v. 69, p. 733-739, 2005.

HAMMES, W.; BANTLEON, A.; MIN, S. Lactic acid bacteria in meat fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 87, p. 165-174, 1990.

HANSEN, E. B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 119-131, 2002.

HERRANZ, B.; FERNÁNDEZ, M.; HIERRO, E.; BRUNA, J. M. ORDÓÑEZ, J. A.; HOZ, L. Use of *Lactobacillus lactis* subsp. cremoris NCDO 763 and  $\alpha$ -ketoglutarate to improve the sensory quality of dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 66, p. 151-163, 2003.

HITCHENER, B. J.; EGAN, A. F.; ROGERS, P. J. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 52, p. 31-37, 1982.

HOFFMANN, F. L., GARCIA-CRUZ, C. H., VINTURIM, T. M.; CARMELLO, M. T. Qualidade microbiológica de amostras de salame. **Bol. CEPPA**, v. 15, p. 57-64, 1997.

HOLZAPFEL, W. H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 197-212, 2002.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T.; MONFORT, J. M. Biochemical characterization of *Lactobacilli* from dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, p. 107-113, 1993.

HUGAS, M.; MONFORT, J. M. Bacterial starter culture for meat fermentation. **Food Chemistry**, v. 59, p. 547-554, 1997.

IBAÑEZ, C.; QUINTANILLA, L.; CID, C.; ASTIASARAN, I.; BELLO, J. Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum* - *Staphylococcus carnosus* Part I: Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the stability and the nitrosation processes. **Meat Science**, v. 44, p. 227-234, 1996.

IBAÑEZ, C.; QUINTANILLA, L.; CID, C.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum* - *Staphylococcus carnosus*. Parte II: Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the proteolytic and insolubilization processes. **Meat Science**, v. 46, p. 277-284, 1997.

INCZE, K. Dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 49, p. 169-177, 1998.

KOMPRDA, T.; SMELÁ, D.; PECHOVÁ, P.; KALHOTKA, L.; STENCL, J.; KLEJDUS, B. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 67, p. 607-616, 2004.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of biactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, p. 171-174, 2001.

LEBERT, I.; LEROY, S.; GIAMMARINARO, P.; LEBERT, A.; CHACORNAC, J. P.; BOVER-CID, S.; VIDAL-CAROU, M. C.; TALON, R. Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. **Meat Science**, v. 76, p. 112-122, 2007.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v. 100, p. 237-240, 2007.

LEROY, F.; De VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 67-78, 2004.

LOBO, M. V., UGALDE, M. G.; FRIES, L. L. M., & KUBOTA, E. H. Avaliação microbiológica de salames coloniais comercializados no município de Santa Maria – RS. **Higiene Alimentar**, v. 88, p. 57-61, 2001.

LÓPEZ, C.; MEDINA, L. M.; PRIEGO, R.; JORDANO, R. Behaviour of the constitutive biota of two types of spanish dry-sausages ripened in a pilot-scale chamber. **Meat Science**, v. 73, p. 178-180, 2006.

LORENZO, J. M.; MICHINEL, M.; LÓPEZ, M.; CARBALLO, J. Biochemical Characteristics of Two Spanish Traditional Dry-cured Sausage Varieties: Androlla and Botillo. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 809-817, 2000.

LÜCKE, F-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, p. 105-115, 2000.

MACEDO, R. E. F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. Curitiba, 2005. 193 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná.

MACEDO, R. E. F.; PLANZER, S. B.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Características de culturas lácticas probióticas para uso em produtos cárneos fermentados: sensibilidade aos sais de cura e uso de antibióticos para contagem seletiva. **Bol. CEPPA**, v. 23, n. 1, p. 123-134, 2005.

MAGNANI A. L.; GIOMBELLI A.; SHUCK M. S.; BUSATO M. A.; SILVA N. L. Incidência de *Salmonella* e *Escherichia coli* em carne suína in natura e salame colonial, consumidos pela população de Chapecó-SC. **Revista Higiene Alimentar**, v. 73, p. 44-47, 2000.

MARTINS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 114-119, 2003.

MATARAGAS, M.; DROSINOS, E. H.; METAXOPOULOS, J. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4 + 2°C. **Food Microbiology**, v. 20, p. 259-265, 2003.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative *Staphylococci* from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, v. 67, p. 149-158, 2004.

MILANI, L. I. G.; FRIES, L. L. M.; PAZ, P. B.; BELLÉ, M.; TERRA, N. N. Bioproteção de lingüiça de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 161-166, 2003.

MIRALLES, M. C.; FLORES, J.; PREZ-MARTINEZ, G. Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. **Food Microbiology**, v. 13, p. 227-236, 1996.

MONTEL, M. C.; MASSON, F.; TALON, R. Bacterial role in *flavour* development. **Meat Science**, v. 49, p. 111-123, 1998.

MOORE, J. E. Gastrointestinal outbreaks associated with fermented meats. **Meat Science**, v. 67, p. 565-568, 2004.

MORETTI, V. M.; MADONIA, G.; DIAFERIA, C.; MENTASTI, T.; PALEARI, M. A.; PANSERI, S.; PIRONE, G.; GANDINI, G. Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. **Meat Science**, v. 66, p. 845-854, 2004.

MOTARJEMI, Y. Impact of a small scale fermentation technology on food safety in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 213-229, 2002.

MUFANDAEDZA, J.; VILJOEN, B. C.; FERESU, S. B.; GADAGA, T. H. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella*

*enteritidis* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 147-152, 2006.

NASSU, R. T.; GONÇALVES, L. A. G.; BESERRA, F. J. Efeito do teor de gordura nas características químicas e sensoriais de embutido fermentado de carne de caprinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1169-1173, 2002.

NGUYEN, T. D. T.; KANG, J. H.; LEE, M. S. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 358-361, 2007.

NIETO-LOZANO, J. C.; REGUERA-USEROS, J. I.; PELÁEZ-MARTÍNEZ, M. C.; TORRE, A. H. Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. **Meat Science**, v. 62, p. 237-243, 2002.

NIETO-LOZANO, J. C.; REGUERA-USEROS, J. I.; PELÁEZ-MARTÍNEZ, M. C.; TORRE, A. H. Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* on Spanish raw meat. **Meat Science**, v. 72, p. 57-61, 2006.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R. P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochemie**, v. 84, p. 593-604, 2002.

ORDOÑEZ, J. A. P.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. Tecnología de Alimentos: Alimentos de origen animal. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 2005, 279 p.

PALEARI, M. A.; BERSANI, C.; VITTORINO, M. M. BERETTA, G. Effect of curing and fermentation on the microflora of meat various animal species. **Food Control**, v. 13, p. 195-197, 2002.

PAPAMANOLI, E.; KOTZEKIDOU, P.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from dry fermented sausage. **Food Microbiology**, v. 19, p. 441-449, 2002.

PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P.; Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v. 65, p. 859-867, 2003.

PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. v. 1, 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524 p.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v. 67, p. 309-317, 2004.

PENNACCHIA, C.; VAUGHAN, E. E.; VILLANI, F. Potential probiotic of *Lactobacillus* strains from fermented sausages: further investigations on their probiotic properties. **Meat Science**, v. 73, p. 90-101, 2006.

PEREIRA, K. S. Patógenos bacterianos em salames. **Revista Nacional da Carne**, v. 328, p.23-24, 2004.

RAHARJO, S.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Improved Speed, Specificity, and Limit of Determination of an Aqueous Acid Extraction Thiobarbituric Acid-C18 Method for Measuring Lipid Peroxidation in Beef. **J.Agric. Food Chem.** v.40, p.2182-2185, 1992.

REUNANEN, J.; SARIS, P. E. J. Bioassay for nisin in sausage; a shelf life study of nisin in cooked sausage. **Meat Science**, v. 66, p. 515-518, 2004.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia Prática: Roteiro e Manual – Bactérias e Fungos**. São Paulo: Atheneu, 1993.

ROISSART, H.; LUQUET, F. M. Bactéries lactiques – Aspects fondamentaux et technologiques. France: Loriga. V. 1, 1994, 605p.

RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Reducing sodium intake from meat products. **Meat Science**, v. 70, p. 531-541, 2005.

SACHINDRA, N. M.; SAKHARE, P. Z.; YASHODA, K. P.; RAO, D. N. Microbial profile of buffalo sausage during processing and storage. **Food Control**, v. 16, p. 31-35, 2004.

SAKHARE, P. Z.; RAO, D. N. Microbial profiles during lactic fermentation of meat by combined starter cultures at high temperatures. **Food Control**, v. 14, p. 1-5, 2003.

SAMELIS, J.; MAUROGENAKIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 179-196, 1994.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; VLASSI, M.; PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 69-82, 1998.

SAMELIS, J.; STAVROPOULOS, S.; KAKOURI, A.; METAXOPOULOS, J. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. **Food Microbiology**, v. 11, p. 447-460, 1994.

SANTOS, E. M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; JAIME, I.; ROVIRA, J.; Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of 'chorizo'. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 123-128, 1998.



SANZ, Y.; FLORES, J.; TOLDRA, F.; FERIA, A. Effect of pre-ripening on microbial and chemical changes in dry fermented sausages. **Food Microbiology**, v. 14, p. 575-582, 1997.

SCHEIDT, G. A.; MINIM, V. P. R.; GOMIDES, L. A. CHAVES, J. B. P.; VANETTI, M. C. D.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S. R. Avaliação físico-química e sensorial de salame tipo italiano contendo diferentes concentrações de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*). **Ciênc. Agrotec.**, Ed. Especial, p. 1576-1583, 2003.

SHAW, B. G.; HARDING, C. D. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, p. 25-40, 1984.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295 p.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 18, p. 32-37, 2004.

SIQUEIRA Jr. W. M.; CARELI, R. T.; ANDRADE, N. J.; MENDONÇA, R. C. S. Qualidade microbiológica de equipamentos, utensílios e manipuladores de uma indústria de processamento de carnes. **Revista Nacional da Carne**, v. 326, p.36-46, 2004.

SIRIKEN, B.; PAMUK, S.; ÖZAKIN, C.; GEDIKOGLU, S.; EYIGÖRM. A note on the incidence of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 serotypes in turkish sausage (Soudjouck). **Meat Science**, v. 72, p.177-181, 2006.

SONDERGAARD, A.; STAHNKE, L. H. Growth and aroma production By *Staphylococcus xilosus*, *S. carnosus* and *S. equorum* – a comparative study in model systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 99-109, 2001.

SOYER, A.; ERTAS, A. H.; ÜZÜMCÜOĞLU, Ü. Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucukus). **Meat Science**, v. 69, p. 135-141, 2005.

SUNESSEN, L. O.; STAHNKE, L. H. Mould starter cultures for dry sausages-selection, application and effects. **Meat Science**, v. 65, p. 935-948, 2003.

TAGG, J. R. and MC. GIVEN, A.R. Assay sistem for bacteriocins. **Applied Microbiol.**, v. 21, p. 943. 1971.

TALON, R.; LEBERT, I.; LEBERT, A.; LEROY, S.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T.; DROSINOS, E. H.; ZANARDI, E.; IANIERI, A.; FRAQUEZA, M. J.; PATARATA, L.; LAUKOVÁ, A. Traditional dry fermented sausages produced in

small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: **Microbial ecosystems of processing environments**, v. 77, p. 570-579, 2007.

TALON, R.; LEROY, S. LEBERT, I. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starter. **Meat Science**, v. 77, p. 55-62, 2007.

TERRA, A. B. M; FRIES, L. L. M; TERRA, N.N. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Varela, 2004. 152 p.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: UNISSINOS, 1998, 216 p.

TERRA, N. N. Particularidades na fabricação do salame. **Revista Nacional da Carne**, v. 317, p. 12-22, 2003.

TILDEN Jr, J; YOUNG, W.; MCNAMARA, A.; CUSTER, C.; BOESEL, B.; LAMBERT-FAIR, M. A.; MAJKOWKI, J.; VUGIA, D.; WERNER, S. B.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS Jr, J. G. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. **American Public Health Association**, v. 86, p. 1142-1145, 1996.

TRINDADE, R. A. **Influência de antioxidantes naturais sobre o perfil lipídico de hambúrgueres bovinos submetidos a irradiação por  $^{60}\text{Co}$  e aceleradores de elétrons**. São Paulo, 2007. 111 f. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

TYÖPPÖNEN, S.; MARKKULA, A.; PETÄJÄ, E.; SUIHKO, M.-L.; MATTILA-SANDHOLM T. Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. **Food Control**, v. 14, p. 181-185, 2003.

TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotic for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 233-244, 2003.

URSO, R.; RANTSIOU, K.; CANTONI, C.; COMI, G.; COCOLIN, L. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 232-239, 2006.

VALSTA, L. M.; TAPANAINEN, H.; MÄNNISTÖ, S. Meat fats in nutrition. **Meat Science**, v. 70, p. 525-530, 2005.

VILLANI, F.; MOSCHETTI, G.; BLAIOTTA, G.; COPPOLA, S. Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern,

DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p. 578-588, 1997.

VIOTT, A.; STOLBERG, J.; PELISSER, M. R. Qualidade microbiológica e físico-química de salames tipo coloniais da região do alto Uruguai catarinense. **Revista Higiene Alimentar**, n. 138, p. 78-83, 2006.

WOOD, B. J.B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie Academic & Professional, v. 2, 1995, 398p.

ZALACAIN, I.; ZAPELENA, M. J.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Addition of lipase from *Candida cylindracea* to a traditional formulation of a dry fermented sausage. **Meat Science**, v. 42, p. 155-163, 1996.

ZALACAIN, I.; ZAPELENA, M. J.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Dry fermented sausage elaborated with lipase from *Candida cylindracea*. Comparison with traditional formulations. **Meat Science**, v. 40, p. 55-61, 1995.

ZAPELENA, M. J.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Dry fermented sausages made with a protease from *Aspergillus oryzae* and/or a starter culture. **Meat Science**, v. 52, p. 403-409, 1999.